

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-517302

(P2014-517302A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53	C
	GO 1 N 33/543	5 O 1 N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2014-513497 (P2014-513497)	(71) 出願人	508012840
(86) (22) 出願日	平成23年11月29日 (2011.11.29)		アボット ポイント オブ ケア インコ ーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月24日 (2014.1.24)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O 8 5 4 0 プリンストン カレッジ ロー ド イースト 4 0 0
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/062452	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開番号	W02012/166199		特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開日	平成24年12月6日 (2012.12.6)	(72) 発明者	ワン、ダン
(31) 優先権主張番号	61/491,088		カナダ国、オンタリオ、カナタ、キングヘ イブン クレッセント 1 6 3
(32) 優先日	平成23年5月27日 (2011.5.27)	(72) 発明者	コリアー、ゴードン、ブルース
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カナダ国、オンタリオ、フィッツロイ ハ ーバー、ムーアヘッド ドライブ 2 5 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T H S 免疫アッセイ及び内在性夾雑物の存在下における T S H 免疫アッセイを限定的な洗浄フォー
ーマットで実施するための方法

(57) 【要約】

本発明は、抗原捕捉、検出抗体添加及び基質導入ステップの間で限定的な洗浄ステップを有する又は洗浄ステップのない E L I S A サンドイッチアッセイを使用する低洗浄甲状腺刺激ホルモン (T S H) 免疫アッセイに関する。本発明は、卵胞刺激ホルモン (F S H)、黄体形成ホルモン (L H) 及び絨毛性ゴナドトロピン (C G) などの生物学的に類似する干渉交差反応性種との低交差反応性を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの捕捉抗体及び少なくとも 1 つのシグナル抗体を含む少なくとも 2 つのエピトープ適合性抗体を含み、両方の抗体の、甲状腺刺激ホルモン (TSH) に対する解離定数 (Kd) が 1 nM 未満又は約 1 nM、たとえば、0.5 nM 以下又は 0.15 nM 以下であり、捕捉抗体の Kd が卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) 及び絨毛性ゴナドトロピン (CG) に対して、それぞれ、1000 nM 超、1000 nM 超、及び 500 nM 超であり、単一洗浄ステップを用いる甲状腺刺激ホルモン (TSH) サンドイッチ免疫アッセイ。

【請求項 2】

捕捉抗体及びシグナル抗体がそれぞれ TSH に対して 0.5 nM 以下の Kd を有する、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 3】

捕捉抗体及びシグナル抗体がそれぞれ TSH に対して 0.15 nM 以下の Kd を有する、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 4】

FSH、LH 及び CG に対するシグナル抗体の Kd が、それぞれ、250 nM 超、35 nM 超及び 35 nM 超である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 5】

捕捉抗体が、6000 超の第 1 の Kd 比、Kd (FSH) 対 Kd (TSH) を有し、シグナル抗体、が 1500 超の第 2 の Kd 比、Kd (FSH) 対 Kd (TSH) を有する、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 6】

第 1 の Kd 比が 3000 超であり、第 2 の Kd 比が 1800 超である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 7】

第 1 の Kd 比が 1500 ~ 50000 に及び、第 2 の Kd 比が 1500 ~ 50000 に及び、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 8】

捕捉抗体が 1000 超の Kd (FSH)、1000 nM 超の Kd (LH) 及び 500 nM 超の Kd (CG) を有し、シグナル抗体が 300 nM 超の Kd (FSH)、35 nM 超の Kd (LH) 及び 35 nM 超の Kd (CG) を有する、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 9】

捕捉抗体が 1000 ~ 5000 nM の Kd (FSH)、1000 ~ 5000 nM の Kd (LH) 及び 500 ~ 5000 nM の Kd (CG) を有し、シグナル抗体が 250 ~ 5000 nM の Kd (FSH)、35 ~ 5000 nM の Kd (LH) 及び 35 ~ 5000 nM の Kd (CG) を有する、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 10】

捕捉抗体及びシグナル抗体が、それぞれ、TSH の TSH - サブユニット上の少なくとも 2 つの異なるエピトープに結合することができる、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 11】

捕捉抗体及びシグナル抗体がエピトープ適合性抗体である、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 12】

捕捉抗体及びシグナル抗体が、以下の捕捉 / シグナル抗体対 5409 / T25C 及び T25C / 5409 から選択される、請求項 1 に記載の免疫アッセイ。

【請求項 13】

捕捉抗体及びシグナル抗体が、以下の捕捉 / シグナル抗体対 5409 / 10 - 1179 - 456 及び 10 - 1179 - 456 / 5409 から選択される、請求項 1 に記載の免疫

10

20

30

40

50

アッセイ。

【請求項 14】

TSH免疫アッセイを実施するための方法であって、

(a) 液体試料を、TSHに対する捕捉抗体を有する免疫センサーを導管中に備えた装置に挿入するステップ、

(b) シグナル抗体を前記液体試料に溶解させるステップ、

(c) 前記捕捉抗体、TSH及び前記シグナル抗体を含むサンドイッチ複合体を前記免疫センサー上で形成するステップ、

(d) 非複合体化シグナル抗体を洗浄液でセンサーから1回以下の洗浄ステップで洗浄するステップ、並びに

(e) 前記複合体化シグナル抗体に伴うシグナルを検出するステップ

を含み、捕捉抗体及びシグナル抗体それぞれがTSHに対して1nM以下の解離定数(Kd)を有する、上記方法。

【請求項 15】

捕捉抗体及びシグナル抗体それぞれがTSHに対して0.5nM以下のKdを有する、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

捕捉抗体及びシグナル抗体それぞれがTSHに対して0.15nM以下のKdを有する、請求項14に記載の方法。

【請求項 17】

捕捉抗体及びシグナル抗体それぞれがTSHに対して0.15nM以下の解離定数(Kd)を有し、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)及び絨毛性ゴナドトロピン(CG)に対する捕捉抗体Kdが、それぞれ、1000nM超、1000nM超及び500nM超であり、FSH、LH及びCGに対するシグナル抗体Kdが、それぞれ、250nM超、35nM超及び35nM超である、請求項14に記載の方法。

【請求項 18】

捕捉抗体が、6000超の第1のKd比、Kd(FSH)対Kd(TSH)を有し、シグナル抗体が、1500超の第2のKd比、Kd(FSH)対Kd(TSH)を有する、請求項14に記載の方法。

【請求項 19】

サンドイッチ複合体が、前記捕捉抗体及び前記シグナル抗体と液体試料との実質的に非連続的な接触により形成される、請求項14に記載の方法。

【請求項 20】

サンドイッチ複合体が、FSH、LH及びCGのうちの1つ又は複数との交差反応を軽減するための1つ又は複数の介在する洗浄ステップなしで形成される、請求項14に記載の方法。

【請求項 21】

液体試料が、希釈された血液試料、非希釈血液試料、希釈された血漿試料又は非希釈血漿試料である、請求項14に記載の方法。

【請求項 22】

捕捉抗体がマウスモノクローナル抗体(Biospecificカタログ番号5409SPTNE-5)を含み、シグナル抗体がマウスモノクローナル抗体(Fitzgeraldカタログ番号10-T25C)を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 23】

捕捉抗体がビーズに共有結合している、請求項14に記載の方法。

【請求項 24】

シグナル抗体が、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ及び蛍光部分からなる群から選択されるレポーター分子にコンジュゲートしている、請求項14に記載の方法。

【請求項 25】

10

20

30

40

50

検出ステップが電気化学的である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 26】

検出ステップが光学的である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 27】

試料及び非結合シグナル抗体を捕捉抗体から取り除くための単一洗浄ステップを含み、洗浄液が、レポーター分子の基質も含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 28】

計量チャンバーで液体試料を計量して 1 ~ 500 μ L の容積を有する計量された試料を作るステップをさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 29】

免疫センサーと流体連通している洗浄液ポーチを破裂させて、前記導管に 5 ~ 500 μ L の洗浄液を放出するステップをさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 30】

前記洗浄液中に複数の空気セグメントを作るステップをさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 31】

捕捉抗体及びシグナル抗体が、それぞれ、TSH の TSH - サブユニット上の少なくとも 2 つの異なるエピトープに結合することができる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 32】

捕捉抗体及びシグナル抗体がエピトープ適合性抗体である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 33】

捕捉抗体及びシグナル抗体が、以下の捕捉 / シグナル抗体対 5409 / T25C 及び T25C / 5409 から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 34】

捕捉抗体及びシグナル抗体が、以下の捕捉 / シグナル抗体対 5409 / 10 - 1179 - 456 及び 10 - 1179 - 456 / 5409 から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 35】

非連続アッセイ及び低洗浄液サイクルのアッセイのための甲状腺刺激ホルモン (TSH) サンドイッチ免疫アッセイ抗体選択方法であって、少なくとも 1 つの捕捉抗体及び少なくとも 1 つのシグナル抗体を含む少なくとも 2 つのエピトープ適合性抗体を選択するステップを含み、捕捉抗体の、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) 及び絨毛性ゴナドトロピン (CG) に対する K_d が、それぞれ、1000 nM 超、1000 nM 超及び 500 nM 超であり、シグナル抗体の、TSH に対する K_d が約 1 nM 未満であり、FSH、LH 及び CG に対する K_d が、それぞれ、250 nM 超、35 nM 超及び 35 nM 超である、上記方法。

【請求項 36】

捕捉抗体及びシグナル抗体それぞれが TSH に対して 0.5 nM 以下の K_d を有する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

捕捉抗体及びシグナル抗体それぞれが TSH に対して 0.15 nM 以下の K_d を有する、請求項 35 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は 2011 年 5 月 27 日提出の米国特許仮出願第 61 / 491, 088 号明細書の優先権を主張し、この特許文献の全内容及び開示を参照により本明細書に組み込む。

【0002】

本発明は、概して、最小限の洗浄能力を有するシステムにおいて免疫アッセイを実施する方法に関する。特に、本発明は、甲状腺刺激ホルモン (TSH) アッセイを、それに関

10

20

30

40

50

連する夾雑（交差反応）内分泌糖タンパク質ホルモン類似物の存在下で実施する方法に関する。本発明は、TSHアッセイを実施するのに最良の性能特性を有する抗体を選択するための方法にも関する。これらのアッセイは、内分泌糖タンパク質ホルモン類似物などの干渉物質の影響をさらに軽減するスカベンジング試薬（scavenging reagent）の包含からも利益を得る。

【背景技術】

【0003】

免疫アッセイは、1959年に初めて開発されたが、ヒト及び動物健康並びに環境試験に有用な感度の高い診断ツールとなっている（Wu、2006、*Clinica Chimica Acta*、369：119）。その適用は当技術分野では一般的かつ周知となっている。

10

【0004】

免疫アッセイを実施するアプローチはいくつか存在し、本発明は非競合的又はサンドイッチ免疫アッセイに焦点を合わせている。免疫アッセイは、不均一又は均一のものに分類することも可能である。均一アッセイのほうが単純なアッセイ特性を有するが高濃度薬物に限られてきた（Engel & Khanna、1992、*Journal of Immunological Methods*、150：99）。不均一アッセイでは、結合物質を非結合物質から分離する必要があり、本発明の焦点である。

【0005】

サンドイッチ免疫アッセイは典型的には、第1に捕捉抗体又は固体支持体に共有結合している抗体への抗原含有試料の導入を伴う2ステップアッセイとして実施される。これに続いて、非特異的試料成分は洗い流し、対象の抗原は固体支持体抗体に結合したままにしておく。第2のステップでは、検出又はシグナル抗体がアッセイに導入され、続いてさらに別の洗浄ステップがある。最後に、検出基質がアッセイに添加されて、抗原濃度を定量する。洗浄ステップを伴う2ステップ免疫アッセイは、バックグラウンド信号を抑えて高感度検出を可能にするので、一般的に好まれる。

20

【0006】

捕捉抗体又は固体支持体に共有結合している抗体へ検出抗体と抗原含有試料と一緒に導入することにより「1ステップ」サンドイッチ免疫アッセイを実施することもある。得られるアッセイは洗浄されて非結合試薬を取り除く。最後に、検出基質がアッセイに添加されて、抗原濃度を定量する。

30

【0007】

1ステップアッセイのほうが簡単であり、特にポイントオブケア適用における、操作に必要なステップ数も少なく、関連ハードウェアの複雑性も少ないので、限定的な洗浄液容積を用いた1ステップアッセイの必要性が存在する。ポイントオブケア装置では、洗浄ステップの必要性を減らすか取り除けば、装置コストとアッセイ時間、ハードウェアコストと複雑性及び使い捨て装置サイズが減少し、これにより今度は環境への廃棄物並びにそのコストを減らすのに有益になる。

【0008】

現在まで、洗浄ステップが限られている又はない1ステップ免疫アッセイは、内在性関連抗原の存在が検出結果を混乱させる高バックグラウンドを生じる場合には、抗原には使用されてこなかった。一部の疾患状態ではよくある内在性抗原が対象の抗原よりも多く高モル濃度で見出される場合には、このことは特に当てはまる。

40

【0009】

問題のある抗原の例は甲状腺刺激ホルモン（TSH）であり、チロトロピンとしても知られ、典型的には関連内分泌糖タンパク質ホルモンである絨毛性ゴナドトロピン（CG）、黄体形成ホルモン（LH）及び卵胞刺激ホルモン（FSH）と結合して存在している。これらの4種の関連ホルモンは、同一のアルファサブユニット及び高度に類似するベータサブユニットを有する（Vassart、2004、*Trends in Biochemical Sciences*、29（3）：119）。その結果、アルファサブユニッ

50

トに対する抗体はこれら4種のホルモンを識別しない(Wada, 1982, *Clinical Chemistry*, 28(9):1862)。特に非常に高濃度の夾雑ホルモンの存在下で、これらの4種の関連ホルモンを識別することができるベータ特異的抗体を同定するのも、これらのホルモンが非常に類似する一次配列を有するために、困難である(Cornell, 1973, *The Journal of Biological Chemistry*, 248(12):4327)。さらに、TSH上の独自の(抗原)エピトープを同定し、これら独自のエピトープを認識する抗体を得るのは困難である。サンドイッチアッセイでは、適切な特異性特徴を有して重複していない捕捉及びシグナル抗体を用いて、抗体の選択をさらに限定するのも重要である。

【0010】

サンドイッチ免疫アッセイにおける洗浄ステップは、反応において夾雑ホルモンの濃度を減少させて、夾雑種に伴うシグナルを抑えるのに役立つ。したがって、洗浄ステップのない又は洗浄能力が限られている1ステップサンドイッチ免疫アッセイは、特に夾雑物が非常に高濃度で存在する場合には、関連する夾雑ホルモン分子の存在下でTSHを特異的に検出することはできなかつた。たとえば、免疫アッセイにおいて洗浄ステップを使用して交差反応種の濃度を減少させる重要性を記載するUS20080311676を参照されたい。これらの問題に取り組む試みは、Hashida et al., 1986, *Analytical Letters*, 19, 1121~36; Soos et al., 1984, *Journal of Immunological Methods*, 73, 237; 及びLode et al., 2003, *Clinical Biochemistry*, 36, 121に見出せる。

【0011】

EP173973には、特定の会合定数値を有する抗サブユニットTSHモノクローナル抗体が使用されるTSHの決定のための方法が記載されている。関連するEP212522には、TSH-サブユニット特異的モノクローナル抗体が異なるエピトープを認識することを特徴とするアッセイが記載されている。この方法は、LH、CG及びFSHなどの他の糖タンパク質ホルモンの存在による障害を抑えようとするものである。

【0012】

1ステップサンドイッチ免疫アッセイ、特に洗浄能力が抑えられている又は取り除かれているポイントオブケアアッセイに使用される1ステップサンドイッチ免疫アッセイ及び特にTSHを検出するための1ステップサンドイッチ免疫アッセイの必要性が存在する。さらに、そのような免疫アッセイを実施することができる抗体試薬を同定する必要性が存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、高度に関連する内在性内分泌糖タンパク質ホルモンである、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)及び絨毛性ゴナドトロピン(CG)により引き起こされる干渉を最小限に抑えつつ、液体試料において甲状腺刺激ホルモン(TSH)を検出するための装置、免疫アッセイ及び方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0014】

一実施形態では、本発明は、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を含み、TSHに対する両方の抗体の解離定数(Kd)が1nM未満又は約1nM、たとえば、0.5nM以下又は0.15nM以下であり、捕捉抗体のKdが卵胞刺激ホルモン(FSH)に対しては1000nM超、2500nM超又は3000nM超であり、黄体形成ホルモン(LH)に対しては500nM超、1000nM超又は3000nM超であり、絨毛性ゴナドトロピン(CG)に対しては200nM超、500nM超又は2500nM超であり、単一洗浄ステップを用いる甲状腺刺激ホルモン(TSH)サンドイッチ免疫アッセイに関する。

10

20

30

40

50

【0015】

別の実施形態では、本発明は、TSH免疫アッセイを実施するための方法であって、(a)液体試料を、TSHに対する捕捉抗体を有する免疫センサーを導管中に備えた装置に挿入するステップ、(b)シグナル抗体を前記液体試料に溶解させるステップ、(c)前記捕捉抗体、TSH及び前記シグナル抗体を含むサンドイッチ複合体を前記免疫センサー上で形成するステップ、(d)非複合体化シグナル抗体を洗浄液でセンサーから1回以下の洗浄ステップで洗浄するステップ、並びに(e)前記複合体化シグナル抗体に伴うシグナルを検出するステップを含む上記方法に関する。好ましくは、捕捉抗体とシグナル抗体はそれぞれ、TSHに対して1nM以下、0.5nM以下又は0.15nM以下の解離定数(Kd)を有する。サンドイッチ複合体は好ましくは、前記捕捉抗体及び前記シグナル抗体と液体試料との実質的に非連続的な接触により形成される。サンドイッチ複合体は好ましくは、FSH、LH及びCGのうちの1つ又は複数との交差反応を軽減するための1つ又は複数の介在する洗浄ステップなしで形成される。この方法は好ましくは、捕捉抗体から試料及び非結合シグナル抗体を取り除く単一洗浄ステップを含み、洗浄液はレポーター分子に対する基質も含む。この方法は計量チャンバーで液体試料を計量して、1~500µLの容積を有する計量された試料を作るステップをさらに含んでもよい。場合により、この方法は、免疫センサーと流体連通している洗浄液ポーチを破裂させて、前記導管に5~500µLの洗浄液を放出するステップを含む。場合により、洗浄液中に複数の空気セグメントを作って免疫アッセイの洗浄を促進させてもよい。

10

【0016】

別の実施形態では、本発明は、非連続アッセイ及び低洗浄液サイクルのアッセイのためのTSHサンドイッチ免疫アッセイ抗体選択方法であって、少なくとも1つの捕捉抗体と少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を選択するステップを含み、捕捉抗体の、TSHに対する解離定数(Kd)が約1nM未満、0.5nM未満又は0.15nM未満であり、捕捉抗体のKd値がFSHに対しては1000nM超、2500nM超又は3000nM超であり、LHに対しては500nM超、1000nM超又は3000nM超であり、CGに対しては200nM超、500nM超又は2500nM超であり、シグナル抗体の、TSHに対するKdが約1nM未満、0.5nM未満又は0.15nM未満であり、シグナル抗体のKdがFSHに対しては250nM超又は1000nM超であり、LHに対しては35nM超、200nM超又は250nM超であり、CGに対しては35nM超又は250nM超である、上記方法に関する。

20

30

【0017】

好ましい態様では、シグナル抗体のKdはFSHに対して好ましくは、250nM超又は1000nM超であり、LHに対しては好ましくは、35nM超、200nM超又は250nM超又は1000nM超であり、CGに対しては好ましくは、35nM超又は250nM超である。場合により、捕捉抗体のKd値はFSHに対しては好ましくは、1000nM超、好ましくは2500nM超又は3000nM超であり、LHに対しては500nM超、1000nM超又は3000nM超であり、CGに対しては好ましくは、200nM超、500nM超又は2500nM超である。範囲に関しては、捕捉抗体は場合により1000~5000nMのKd(FSH)、500~5000nMのKd(LH)及び200~5000nMのKd(CG)を有しており、シグナル抗体は好ましくは、250~5000nMのKd(FSH)、200~5000nMのKd(LH)及び35~5000nMのKd(CG)を有している。さらに好ましくは、捕捉抗体は1000~5000nMのKd(LH)及び500~5000nMのKd(CG)を有し、さらに好ましくは、シグナル抗体は35~5000nMのKd(LH)を有している。用いられる液体試料は好ましくは、希釈された血液試料、非希釈血液試料、希釈された血漿試料又は非希釈血漿試料を含む。

40

【0018】

捕捉抗体及びシグナル抗体はそれぞれが好ましくは、TSHのTSH-サブユニット上の少なくとも2つの異なるエピトープに結合することができる。したがって、捕捉抗体

50

及びシグナル抗体は好ましくは、エピトープ適合性抗体である。特に好ましい実施形態では、捕捉抗体及びシグナル抗体は次の捕捉/シグナル抗体対、5409/T25C及びT25C/5409から選択される。たとえば、捕捉抗体はマウスモノクローナル抗体(Biospecific カタログ番号5409SPTNE-5)を含んでいてもよく、シグナル抗体はマウスモノクローナル抗体(Fitzgerald カタログ番号10-T25C)を含んでいてもよい。

【0019】

一態様では、捕捉抗体は2500超、たとえば、3000超の第1のKd比、Kd(FSH)対Kd(TSH)を有し、シグナル抗体は1500超、たとえば、1800超の第2のKd比、Kd(FSH)対Kd(TSH)を有する。場合により、第1のKd比は1500~50000に及び、第2のKd比は1500~50000に及ぶ。さらに好ましくは、捕捉抗体は6000超の第1のKd比、Kd(FSH)対Kd(TSH)を有する。

10

【0020】

本発明は、以下の非限定的図に照らしてみればさらによく理解されることになる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】免疫センサーカートリッジカバーの等尺上面図である。

【0022】

【図2】免疫センサーカートリッジカバーの等尺下面図である。

20

【0023】

【図3】免疫センサーカートリッジのためのテーブガセットのレイアウトの上面図である。

【0024】

【図4】免疫センサーカートリッジ底の等尺上面図である。

【0025】

【図5】免疫センサーカートリッジのレイアウトの略図である。

【0026】

【図6】乾燥試薬を用いて液体を修正するための部位を含む、免疫センサーカートリッジ内の流体及び空気経路の略図である。

30

【0027】

【図7】CG及びそのKd値の決定のためのFRETベースの結合データを示す図である。

【0028】

【図8】FSH及びLHの磁気ビーズ捕捉を示す図である。

【0029】

【図9】ポリスチレンビーズを使用するFSHの減少した交差反応性を示す図である。

【0030】

【図10】ポリスチレンビーズを使用するLHの減少した交差反応性を示す図である。

40

【0031】

【図11】磁気ビーズを使用するFSHの減少した交差反応性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

序論

様々な実施形態で、本発明は、好ましくは洗浄ステップが限られている又は洗浄ステップがない、干渉物質の存在下でサンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を実施するための免疫アッセイ、装置及び方法に関する。本発明は、これらの夾雑干渉物質の存在下で正確なアッセイ結果を可能にして有益である。第1の実施形態では、本発明は甲状腺刺激ホルモン(TSH)サンドイッチ免疫アッセイを行うための装置及び方法並びにそのような免疫アッセイ用の抗体を選択するための方法に関する。第2の実施形態では

50

、本発明は、免疫アッセイに、特にTSH免疫アッセイに、並びに単一洗浄ステップを用いる又は洗浄ステップなしの関連する装置及び方法に関する。第3の実施形態では、本発明は、免疫アッセイに、特にTSH免疫アッセイに、並びにそのような夾雑物に伴う干渉を抑える又は取り除く内在性夾雑物に対する抗体で被覆されたスカベンジャービーズ(sca venger bead)を用いる関連する装置及び方法に関する。代わりに、そのような抗体はカートリッジ表面に共有結合していてもよいし、反応媒体中の遊離の抗体を含んでいてもよい。場合により、これらの実施形態のうちの1つ又は複数を互いに組み合わせてもよい。

【0033】

TSH免疫アッセイ及びTSH免疫アッセイ用の抗体を選択するための方法

第1の実施形態では、本発明は、TSHについての免疫アッセイに並びにそのような免疫アッセイを行うための関連する装置及び方法に関する。本発明の免疫アッセイは、高度に関連する内在性内分泌糖タンパク質ホルモンである、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)及び絨毛性ゴナドトロピン(CG)が存在するにも関わらずTSHの正確な検出を提供して有益である。ある種の疾患状態では、これらの関連ホルモンは著しく高濃度で存在することがある。低洗浄容積プラットフォームである、i-STAT(登録商標)免疫アッセイプラットフォーム(Abbott Point of Care Inc.、Princeton、NJ、USA)に関するアッセイが本明細書に例示されている。共同所有されている米国特許第7,419,821号を参照されたい。この特許の全体は参照により本明細書に組み込まれる。本特許明細書では、用語「低洗浄」は、典型的には数十マイクロリットルから約5ミリリットルの桁で比較的少量の洗浄液を含むポーチを組み込んでいる有効な使い捨て検査装置又は類似する量の洗浄液が、装置が結合している機器から供給される類似の装置を含むと解釈される。いくつかの例となる実施形態では、装置と方法は5~500 μ L、たとえば、25~250 μ L又は50~150 μ L、好ましくは約100 μ Lの洗浄量を用いる。本発明は、捕捉抗体、分析物及びシグナル抗体が混合されてサンドイッチ免疫アッセイを形成し、次に洗浄液を使用して、非結合分析物及び非結合シグナル抗体を含む試料を、たとえば磁性があってもよいビーズ上又はセンサー上などの、好ましくはある方法で固定化されている捕捉抗体上に形成されているサンドイッチから取り除くアッセイという構想も含む。これらの種類の装置及びシステムは一般には患者ケアの時点で検査することと関連している。

【0034】

別の態様では、本発明は、洗浄能力が限られているシステムにおいてサンドイッチELISAアッセイを実施するための抗体を選択する方法に関する。具体的には、交差反応性が減少した抗体が選択され、このことが今度はサンドイッチELISAにおける分析特異性を増加させる。これらの特徴は、低洗浄サンドイッチELISAアッセイにおいては特に有用である。特定の例として、内在性内分泌糖タンパク質ホルモンであるFSH、LH及びCGの存在下でi-STAT(登録商標)カートリッジを使用するTSHアッセイの性能は本明細書において実証されている。これとは対照的に、TSHをアッセイする典型的先行市販システムは複数の洗浄ステップを利用して、ある種の疾患状態下では高モル濃度で存在することができる内在性内分泌糖タンパク質ホルモンの存在を減少させる。しかし、これらの複数の洗浄システムは本明細書において開示されるこれらの特異性特徴を有する抗体の使用からも利益を得ること、また、本発明は限られた洗浄能力を用いる免疫アッセイシステム又は装置に限定されると考えるべきではないことは明らかである。

【0035】

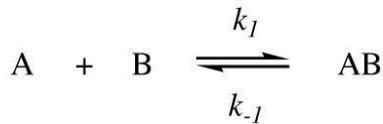
好ましい実施形態では、2種類のサンドイッチ抗体は、主にTSH分子のベータサブユニット又は所望の程度の特異性を示しているこの領域と重複しているエピトープに対して選択される。これら2種類のサンドイッチ抗体の理想的特徴は、TSHのベータサブユニットのエピトープ(好ましくは異なるエピトープ)を認識し、TSHのアルファサブユニットだけには限られないことである。この認識は、アルファサブユニットとベータサブユニットの両方にまたがるエピトープであって、TSHに対し高親和性を、その他の交差反

応性種に対しては低親和性を示す上記エピトープを含むことができることが企図されている。さらに、これらの抗体は好ましくは、TSH分子には低Kdを示し、その他の内在性糖タンパク質ホルモンであるFSH、LH及びCGには高Kd値を有する。

【0036】

本明細書で使用されるように、用語「解離定数」又は「Kd」とは、一般的反応の平衡定数のことであり、

【数1】



10

Aは抗体、Bは分析物、すなわち抗原である。この反応では、解離定数又はKd値は、

【数2】

$$Kd = \frac{[A] \times [B]}{[AB]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

20

として表される。一般的には、解離定数が低いほど、抗体Aが分析物Bに対して持つ親和性又は結合の程度はそれだけ大きくなる。これらの動力学値を決定する方法は当技術分野では周知である。たとえば、Goodrich & Kugel、2007、Binding and Kinetics for Molecular Biologists、Cold Spring Harbour Laboratory Press、Cold Spring Harbour、New Yorkを参照されたい。

【0037】

特に好ましい実施形態では、捕捉抗体及びシグナル抗体はTSHに対して高親和性（低Kd）を示す。低濃度では弱いシグナルを出す抗体は高可変性（ノイズ）を有し、さらに高い測定される交差反応性と識別するのが困難になる。これらの抗体は候補抗体として選択すべきではない。特に好ましい実施形態では、TSH抗原に対して1nM以下、たとえば、0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下のKdを有する抗体が選択されて、本発明の免疫アッセイのための捕捉抗体及び/又はシグナル抗体として機能する。

30

【0038】

サンドイッチハイブリダイゼーションのために選択される2つ以上の抗体についての好ましい実施形態では、FSH、LH及びCGに対する最大のKd値を有する抗体は捕捉抗体として使用されることになる。別の態様では、2つの抗体が捕捉抗体及びシグナル抗体の候補として同定される場合、大きいほうのKd値（たとえば、5~1000%、20~100%又は20~50%大きい）を有する抗体は捕捉抗体として好まれる場合がある。どちらの場合にも、TSHに対して低Kd値、たとえば1nM以下、0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下を有することに加えて、抗体（捕捉抗体及びシグナル抗体）は、干渉する内在性糖タンパク質ホルモンであるFSH、LH及びCGのそれぞれに対しては比較的高Kd値を有することが望ましい。

40

【0039】

特に好ましい実施形態では、捕捉抗体は、1000nM超、2500nM超、3000nM超又は4000nM超のKd（FSH）、500nM超、800nM超、1000nM超、2500nM超又は4000nM超のKd（LH）、及び200nM超、500nM超、2500nM超又は4000nM超のKd（CG）を有する。範囲に関しては、捕捉抗体は、場合により1000~5000nM、1500~4000nM又は2500~3000nMに及ぶKd（FSH）、500~5000nM、750~1200nM又は

50

800 ~ 1000 nM、1000 ~ 5000 nM又は1500 ~ 4000 nMに及ぶKd (LH)及び35 ~ 5000 nM、200 ~ 5000 nM、210 ~ 2500 nM又は220 ~ 500 nMに及ぶKd (CG)を有する。

【0040】

同様に、シグナル抗体は好ましくは、250 nM超、1000 nM超又は4000 nM超のKd (FSH)、35 nM超、200 nM超、250 nM超、1000 nM超、2500 nM超又は4000 nM超のKd (LH)、及び35 nM超、250 nM超又は2500 nM超のKd (CG)を有する。範囲に関しては、シグナル抗体は、場合により250 ~ 5000 nM、250 ~ 2500 nM又は250 ~ 500 nMに及ぶKd (FSH)、35 ~ 5000 nM、200 ~ 5000 nM、35 ~ 2500 nM、200 ~ 2500 nM、35 ~ 1000 nM又は200 ~ 1000 nMに及ぶKd (LH)及び35 ~ 5000 nM、35 ~ 2500 nM又は35 ~ 1000 nMに及ぶKd (CG)を有する。この方法の特定の実施形態では、TSH結合種は好ましくは、抗体、抗体の断片(たとえば、Fab断片)、一本鎖抗体、アダマー、受容体及び他の特異的結合種から選択される。

10

【0041】

本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を含み、TSHに対する両方の抗体のKdが約1 nM未満(又は以下)、たとえば、0.5 nM以下、0.15以下又は0.1 nM以下であり、FSH、LH及びCGに対する捕捉抗体のKdがそれぞれ約2500超、約500超及び約200 nM超であり、FSH、LH及びCGに対するシグナル抗体のKdがそれぞれ約250超、約200超及び約35 nM超である、TSHサンドイッチ免疫アッセイに取り組む。さらに好ましくは、CGに対する捕捉抗体のKdは約35 nM超であり、LHに対するシグナル抗体のKdは約35 nM超である。これに関連して、「エピトープ適合性」は、上記のように、対象の分析物上の異なるエピトープに選択的に結合することができることを意味する。TSH免疫アッセイでは、抗体は好ましくは、少なくとも一部がTSHのベータサブユニット上にある異なるエピトープに選択的に結合することができる。

20

【0042】

FSH、LH及びCGと比べたTSHに対する捕捉抗体及びシグナル抗体の相対的選択性は、Kd比、すなわちKd(内分糖タンパク質ホルモン類似体、たとえばFSH、LH、CG又はその平均)対Kd(TSH)の比の点からも特徴付けることができる。この態様では、Kd比値が大きいほど、分母の内分糖タンパク質ホルモン類似体と比べたTSHに選択的に結合する抗体の能力はそれだけ大きくなる。一態様では、たとえば、固定化された抗体は、2500超、たとえば、3000超又は5000超の第1のKd比、 Kd_{FSH} 対 Kd_{TSH} を有する。さらに又は代わりに、シグナル抗体は、1500超、たとえば、1800超又は2000超の第2の解離定数比、 Kd_{FSH} 対 Kd_{TSH} を有する場合がある。範囲に関しては、固定化された抗体は好ましくは、1500 ~ 50000、たとえば、1800 ~ 30000又は2000 ~ 28000の第1のKd比、 Kd_{FSH} 対 Kd_{TSH} を有し、シグナル抗体は、1500 ~ 50000、たとえば、1800 ~ 30000又は1900 ~ 20000の第2のKd比、 Kd_{FSH} 対 Kd_{TSH} を有する場合がある。

30

40

【0043】

上記のように、免疫アッセイは好ましくは、2つの非重複エピトープでTSHに結合する一対の異なる抗体を用いる。特に好ましい実施形態では、捕捉抗体はTSH捕捉マウスモノクローナル抗体(たとえば、Biospacificカタログ番号5409SPTNE-5)を含み、シグナル抗体はシグナル伝達マウスモノクローナル抗体(たとえば、Fitzgeraldカタログ番号10-T25C)を含む。この態様では、捕捉抗体は好ましくはビーズ、たとえばラテックス及び/又はポリスチレンビーズに共有結合しており、シグナル抗体は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ及び蛍光又は

50

光学的吸収部からなる群から選択されるレポーター分子にコンジュゲートしている。検出ステップは好ましくは、電気化学的、たとえば、電流測定であるが、光学的、たとえば、蛍光及び吸光であることも可能である。

【0044】

本発明は、リガンド結合アッセイとしても特徴付けることができる。たとえば、一実施形態では、本発明は、少なくとも1つの捕捉リガンド及び少なくとも1つのシグナルリガンドを含み、TSHに対する両方のリガンドの解離定数が約1 nM未満（又は以下）、たとえば、0.5 nM以下、0.15 nM以下又は0.1 nM以下であり、FSH、LH及びCGに対する捕捉リガンドのKdがそれぞれ約2500超、約500超及び約200 nM超であり、FSH、LH及びCGに対するシグナルリガンドのKdがそれぞれ約250超、約200超及び約35 nM超である、TSHサンドイッチアッセイに関する。さらに好ましくは、捕捉リガンドのKdは、LHに対しては約1000 nM超であり、CGに対しては約500 nM超であり、LHに対するシグナルリガンドのKdは約35 nM超である。ここでは、リガンドは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体の断片、アプタマー及び一本鎖抗体からなる群から選択してもよい。

10

20

30

40

50

【0045】

本発明は、TSHに対して高度に選択的でありFSH、LH及びCGなどの競合する内分泌糖タンパク質ホルモン類似体に対して非選択的である免疫アッセイを用いて、分析物、たとえばTSHを検出するための方法も目的とする。たとえば、一実施形態では、本発明は、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を使用して全血TSHサンドイッチアッセイを実施する方法に関する。TSHに対する両方の抗体のKdは1 nM未満又は約1 nM、たとえば、0.5 nM以下、0.15 nM以下又は0.1 nM以下である。FSH、LH及びCGに対する捕捉抗体のKd値は、それぞれ約2500超、約500超及び200 nM超であり、FSH、LH及びCGに対するシグナル抗体のKd値は、それぞれ約250超、約200超及び約35 nM超である。さらに好ましくは、FSH、LH及びCGに対する捕捉抗体のKd値は、それぞれ約1000超、約1000超及び1000 nM超であり、LHに対するシグナル抗体のKd値は約35 nM超である。この方法は、(a) TSHシグナル抗体及び電気化学的センサー上に固定化されたTSH捕捉抗体に全血試料を接触させてサンドイッチ複合体を形成するステップ、並びに(b) 前記複合体化シグナル抗体に伴うシグナルを検出するステップを含む。

【0046】

本発明は、TSHの検出以外の有用性を有する。たとえば、一態様では、本発明は、少なくとも1つの捕捉抗体又はリガンド及び少なくとも1つのシグナル抗体又はリガンドを含む少なくとも2つの抗体又は他のリガンドを含む全血試料で実施される分析物サンドイッチ免疫アッセイであって、分析物の、前記少なくとも2つの抗体又はリガンドに対するKdが、少なくとも2つの選択された既知の交差反応物（タンパク質配列夾雑抗原と密接な関係がある）に対するKdより、少なくとも前選択したレベルで低い、たとえば、500分の1、1000分の1又は10000分の1である、上記分析物サンドイッチ免疫アッセイに関する。この態様では、サンドイッチは好ましくは、試料への実質的に非連続的抗体又はリガンド添加により形成される。アッセイは検出に先立つ単一洗浄ステップを用いて実施してもよい。ここで、たとえば、標的分析物は、TSH、FSH、LH及びCGのうちの一つであることが可能であり、交差反応物はTSH、FSH、LH及びCGからなる群から選択してもよいが、標的分析物ではない。したがって、本発明の他の実施形態では、標的分析物はTSHではなく、FSH、LH及びCGのうちの一つから選択してもよい。

【0047】

低洗浄サンドイッチ免疫アッセイ

FSH、LH及びCGなどの競合する内分泌糖タンパク質ホルモン類似体と比べたTSHに対する上記の抗体又はリガンドの選択性は、限定的な洗浄ステップを用いる免疫アッ

セイに特に適している本発明の免疫アッセイ、装置及び方法に役立つ。したがって、本発明は、相当量の洗浄液のためのスペースが十分でない分析検査カートリッジ又は装置を用いることがある、i - S T A T (登録商標)免疫アッセイフォーマットなどのポイントオブケア検査装置の実行に特によく適している。

【0048】

従来のTSHアッセイでは、FSH、LH及びCGのうちの1つ又は複数に伴う交差反応を軽減するためには、複数の繰り返される洗浄ステップを用いることが正確な結果に決定的に重要である。本発明のいくつかの実施形態によれば、サンドイッチが試料への非連続的抗体添加により形成される、すなわち捕捉抗体及びシグナル抗体がこの試料にほぼ同時に、介在する洗浄ステップなしで接触する場合にアッセイは機能する。アッセイは、場合により、検出に先立つ単一洗浄ステップ、たとえば血液及び非結合シグナル抗体を捕捉抗体から取り除く1回に限定的な洗浄ステップを含む。したがって、第2の実施形態では、本発明は洗浄ステップが減らされた免疫アッセイに関する。この実施形態の一態様では、単一洗浄ステップを使用して非結合分析物及びシグナル抗体をサンドイッチアッセイから取り除く。

10

【0049】

この実施形態の一態様では、本発明は、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を含み、TSHに対する両方の抗体のKdが1nM未満又は約1nM、たとえば0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下であり、FSH、LH及びCGに対する捕捉抗体のKdが、それぞれ約2500nM超、約500nM超及び約200nM超であり、単一洗浄ステップを用いるTSHサンドイッチ免疫アッセイに関する。さらに好ましくは、FSH、LH及びCGに対する捕捉抗体のKdが、それぞれ、約1000nM超、約1000nM超及び約1000nM超である。これとの関連で、「単一洗浄ステップ」とは、洗浄液(好ましくは分析物及びシグナル抗体が実質的にない)が免疫センサーに向けられて非結合分析物及び非結合シグナル抗体を免疫センサーの領域から取り除く洗浄ステップのことである。単一洗浄ステップにおいて用いられる洗浄液の量は大きく異なってもよいが、好ましくは1000µL未満、750µL未満、500µL未満又は250µL未満である。本発明において用いられる免疫センサーの種類は大きく異なってもよく、たとえば、電気化学センサー、弾力表面波センサー、表面プラズモン共鳴センサー、温度センサー、電界効果トランジスタセンサー、光学センサー、エバネッセント波センサー、導波管センサー、等から選択してもよい。

20

30

【0050】

本発明は、分析物、たとえば、TSHを1回以下の洗浄ステップを用いる免疫アッセイで検出するための方法も目的とする。たとえば、一実施形態では、本発明は、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を使用して全血TSHサンドイッチアッセイを実施する方法に関する。TSHに対する両方の抗体のKdは、1nM未満又は約1nM、たとえば、0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下である。FSH、LH及びCGに対する捕捉抗体のKd値は、それぞれ約2500nM超、約500nM超及び約200nM超であり、FSH、LH及びCGに対するシグナル抗体のKd値は、それぞれ約250nM超、約200nM超及び約35nM超である。さらに好ましくは、FSH、LH及びCGに対する捕捉抗体のKd値は、それぞれ約1000nM超、約1000nM超及び約1000nM超であり、LHに対するシグナル抗体のKd値は約35nM超である。この方法は、(a)全血試料をTSHシグナル抗体及び電気化学的センサー上に固定化されたTSH捕捉抗体に接触させてサンドイッチ複合体を形成するステップ、(b)試料及び非複合体化シグナル抗体を前記センサーから洗浄するステップ、並びに(c)前記複合体化したシグナル抗体に伴うシグナルを検出するステップを含む。

40

【0051】

この実施形態では、洗浄液は好ましくは、水及び1つ又は複数の添加物を含む液体を含

50

み、望ましい程度にセンサーを洗浄することができなければならない。一態様では、洗浄液は酵素基質ANPP（リン酸アミノニトロフェニル）を含む。洗浄液pHは好ましくは、レポーター酵素に最適であるように維持され、これはアルカリホスファターゼでは、約9～10の最適アルカリ性pHである。洗浄液は好ましくは、電気化学アッセイにおける電気伝導度に影響を与える塩も含み、これは塩化ナトリウム及びマグネシウムにより供給される。マグネシウムはアルカリホスファターゼの補因子でもあり、低濃度で存在して酵素活性を増強することがある。他の酵素ベースのアッセイのための洗浄液は、溶液中での酵素安定性のために、電気化学であれば電気伝導度のために必要な適切な酵素基質、塩及び緩衝剤も、任意の適切な酵素補因子と共に含有すると考えられる。

【0052】

既知の干渉物質に対するスカベンジャービーズの包含

第3の実施形態では、本発明は、1つ又は複数のスカベンジャービーズを用いるTSHサンドイッチ免疫アッセイに、並びにそのような免疫アッセイを行うための関連する装置及び方法に関する。分析物、たとえば、TSHに対するアッセイの選択性を増強するために、たとえば、交差反応物、たとえば、FSH、LH、CGに対する抗体で標識されたラテックス又はポリスチレンビーズを含むスカベンジャービーズが試料中に溶解する混合物に添加される実施形態が考案された。このようにして、交差反応物には、TSH捕捉抗体上の比較的好ましくない結合部位と試料中に溶解させたビーズ上の比較的好ましい結合部位とが与えられる。

【0053】

この実施形態の一態様では、たとえば、本発明は、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を含む免疫アッセイに関する。このアッセイは、FSH、LH、CGに対する抗体（ビーズ抗体）で被覆されたスカベンジャービーズをさらに含み、前記抗体のそれぞれのKdが、FSH、LH及びCGのそれぞれに対して、1nM未満又は約1nM、たとえば、0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下であり、TSHに対する前記ビーズ抗体のそれぞれのKdが約250nM超である。免疫アッセイにおいて用いられる捕捉抗体及びシグナル抗体のTSHに対するKdは、好ましくは、上記の通り、約1nM未満（又は以下）、たとえば、0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下である。

【0054】

したがって、一実施形態では、本発明は、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つのシグナル抗体を含む少なくとも2つのエピトープ適合性抗体を用い、1つ又は複数のスカベンジャービーズを使用して、そうでなければ競合する内分泌糖タンパク質ホルモン類似体であるFSH、LH及びCGにより引き起こされることがある干渉を抑えるTSHサンドイッチ免疫アッセイに関する。ここでは、TSHに対する捕捉抗体及びシグナル抗体のKdは好ましくは、1nM未満又は約1nM、たとえば、0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下である。添加されたスカベンジャービーズはFSH、LH及びCGに対するビーズ抗体で被覆されており、これらの抗体ごとに対するKdは好ましくは、それぞれFSH、LH及びCGごとに対して、1nM未満又は約1nM、たとえば、0.5nM以下、0.15nM以下又は0.1nM以下である。

【0055】

一態様では、ビーズは、競合する内分泌糖タンパク質ホルモン類似体ごとに選択的である単一種類の抗体で被覆されている。別の態様では、ビーズは複数種類の抗体で被覆されており、第1のビーズ抗体はFSHに対して選択的であり、第2のビーズ抗体はLHに対して選択的であり、第3のビーズ抗体はCGに対して選択的である。たとえば、第1のビーズ抗体はFSH及びLHに対して選択的であり、第2のビーズ抗体はCGに対して選択的であるビーズ抗体の他の組合せも可能である。

【0056】

別の態様では、複数の異なるビーズを用いてもよい。たとえば、競合する内分泌糖タンパク質ホルモン類似体を選択的に結合する、それぞれが異なる抗体を有する3種類の異なる

10

20

30

40

50

るビーズを用いてもよい。たとえば、免疫アッセイ、装置及び方法は、それぞれF S H、L H及びC Gに選択的に結合する第1のビーズ、第2のビーズ及び第3のビーズを用いてもよい。さらに具体的には、第1のビーズはF S Hに対して選択的な第1のビーズ抗体を含み、第2のビーズはL Hに対して選択的な第2のビーズ抗体を含み、第3のビーズはC Gに対して選択的な第3のビーズ抗体を含んでいてもよい。

【0057】

T S Hがこれらのビーズに優先的に結合するのを回避するために、T S Hに対するビーズ抗体（1種類のビーズ上であれば複数種類のビーズ上であれば）のそれぞれのK dは約250 n M超であることが望ましい。抗体標識化に関してのスカベンジャービーズの調製は、T S Hに対する捕捉抗体について本明細書に記載されている方法に従う。上記の実施形態の場合と同じように、F S H、L H及びC Gに対するT S H捕捉抗体のK dは、それぞれ約2500 n M超、約500 n M超及び約200 n M超であることが好ましい。同様に、F S H、L H及びC Gに対するT S Hシグナル抗体のK dは、それぞれ約250 n M超、約200 n M超及び約35 n M超であることが望ましい。

【0058】

スカベンジャービーズは非磁性であり、試料中に懸濁したままでも可能であり、したがって、洗浄ステップ及び検出ステップに先立って試料と一緒に廃棄物チャンバーに取り除かれることに留意されたい。代わりに、スカベンジャービーズは磁性があってもよく、T S H捕捉部位領域、たとえばT S H免疫センサーから離れている装置の領域に、磁界を適用することにより引き付けられる。代わりに、スカベンジャービーズは磁性があるが、磁界を適用して又は適用せずに廃棄物チャンバーに取り除かれてもよい。磁気ビーズを免疫センサーに磁氣的に保持しておくための様々な手段は、M i l l e rへの米国特許出願第61/371,066号明細書に記載されており、この特許文献の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0059】

交差夾雑物干渉を抑える磁気スカベンジャービーズの使用は図8に図解されている。示されるように、L Hに対して選択的なスカベンジャー抗体を有する磁気ビーズが試料に添加され、試料中に含有されるL Hに選択的に結合する。たとえば、永久磁石から又は電磁石からの磁界は、センサーから離れた好ましくはその上流の領域に磁気ビーズを局在化するように、装置（カートリッジ）において又は装置読取り機においてのいずれかで印加される。これにより、交差反応する又は競合する分析物、ここではL Hからの干渉が抑えられて有利である。

【0060】

好ましい実施形態では、犠牲ビーズ（sacrificial bead）は乾燥試薬被覆に取り込まれ、この被覆はいくつかの実施形態では、シグナル抗体を含有する同じ乾燥試薬被覆であってもよい。したがって、一実施形態では、分析装置には、（a）F S H、L H若しくはC Gのうちの1つ若しくは複数の影響を軽減するのに適している犠牲ビーズ及び/又は（b）シグナル抗体若しくは標識分析物などのシグナル発生試薬のどちらか又は両方を含む乾燥試薬被覆が含まれる。乾燥試薬被覆は、好ましくは（a）F S H、L H若しくはC Gのうちの1つ若しくは複数の影響を軽減するのに適している犠牲ビーズ及び/又は（b）シグナル抗体若しくは標識分析物などのシグナル発生試薬のどちらか又は両方も含む試薬カクテルから形成されてもよい。一態様では、試薬被覆及び/又はカクテルは、米国特許同時係属出願第12/411,325号明細書に開示されている、異好抗体により引き起こされる干渉を軽減するためのI g M又はその断片をさらに含んでおり、この特許文献は参照によりその全体を組み込まれている。試薬カクテルが置かれることとなる表面は、好ましくは先ずコロナ処理されて、プリントされたカクテルの広がりを促進することになる荷電表面基を提供する。

【0061】

一般的には、乾燥試薬被覆を形成するのに使用される試薬カクテルは、水溶性タンパク質、アミノ酸、ポリエーテル、ヒドロキシル基を含有するポリマー、糖又は炭水化物、塩

10

20

30

40

50

及び場合により色素分子をさらに含んでいてもよい。それぞれの成分の1つ又は複数を使用することができる。一実施形態では、カクテルは、ウシ血清アルブミン(BSA)、グリシン、塩、メトキシポリエチレングリコール、ショ糖及び場合により、プリンティング過程を視覚化するのに役立つ色を提供するプロモフェノールブルーを含有する。一実施形態では、1~20 μ Lのカクテルが、分析装置の、たとえば保持チャンバー又は他の導管内の所望の表面にプリントされ、そのカバーと組み立てられる前に風乾させておく(加熱して又は加熱せずに)。好ましい態様では、試薬カクテル及びそこから形成される乾燥試薬被覆は、ラクチトール、DEAE-デキストラン、マグネシウム及び塩化ナトリウムなどの塩、IgG/IgM、ヘパリン、界面活性剤(単数又は複数)並びにローダミンのうちの1つ又は複数を含む。

10

【0062】

試薬カクテルは好ましくは、犠牲ビーズ及び場合により他の干渉低減試薬を含有するプリント可能な水溶液として処方される。生体試料、たとえば血液を導入すると、試料は好ましくは、アッセイの第1ステップで試薬と混合する。試薬はまた、化学的及び流体属性に関してアッセイ性能を最適化する無機塩及び界面活性剤を含んでいてもよい。他の任意の添加剤は、十分な抗凝血を保證するヘパリン及びプリント後の試薬の位置を視覚化するための色素を含んでいてもよい。場合により、微生物増殖を阻害するためのアジ化ナトリウムなどの安定化剤及びタンパク質の安定化のためのラクチトールとジエチルアミノエチル-デキストラン(Applied Enzyme Technologies Ltd、Monmouth House、Mamhilad Park、Pontypool、NP4 0HZ UK)の混合物も存在する。いったん装置に置かれると、置かれた試薬は、たとえば、温風流中で30~60分間乾燥させてもよい。一実施形態では、試薬は自動プリント機器を使用して装置の試料注入口にプリントされ、乾燥されて試薬被覆層を含有する犠牲ビーズを形成する。

20

【0063】

別の実施形態では、検査カートリッジは、複数の乾燥試薬被覆を含んでいてもよい(その場合、被覆は、それを区別するために、それぞれ第1試薬被覆、第2試薬被覆、等と呼んでもよい)。たとえば、犠牲ビーズは第1試薬被覆に含まれてもよく、第1試薬被覆は、たとえば、シグナル抗体を含有する第2試薬被覆に隣接していてもよい。この態様では、第2試薬被覆は第1試薬被覆の上流に又は下流に位置していてもよいが、シグナル抗体を含有する試薬被覆が犠牲ビーズを含有する試薬被覆の下流に位置しているのが好ましい。好ましい実施形態では、保持チャンバーは、犠牲ビーズ及び場合により様々な形態の干渉を軽減する他の試薬を含む第1試薬被覆で被覆されている。この態様では、シグナル抗体を含む第2試薬被覆は、好ましくは保持チャンバーの下流、すなわち免疫センサーのすぐ上流に位置している。

30

【0064】

さらに他の実施形態では、犠牲ビーズは、分析装置、たとえば、カートリッジの一部でなくてもよい。たとえば、犠牲ビーズは試料収集装置、たとえば、キャピラリー、バキューテナー(Vacuainer)(商標)又は注射器に組み込まれていてもよい。たとえば、犠牲ビーズ被覆は、収集装置の内壁上で形成されてもよい。したがって、一実施形態では、本発明は、第1容器又は位置で血液試料を修正するのに先ず使用される犠牲ビーズを含む免疫アッセイを実施し、次に試料は捕捉抗体及びシグナル抗体を有する第2容器又は位置に通されるためのキットに関する。

40

【0065】

本明細書で考察されるビーズに加えて又はビーズの代わりとして、試料は、Campbell et al.への共同所有されている米国特許出願第12/620,179号明細書に記載されている種類の犠牲ビーズ(場合により、白血球にオプソニン化されている)で修正されてもよく、この特許文献の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0066】

免疫センサー製作

50

上記のように、本発明は、電気化学免疫センサーを使用する i - S T A T (登録商標) システムを参照することにより最もよく説明される。免疫センサーの好ましい実施形態のウェハレベルの微細加工は以下の通りである。ベース電極は、15 μm センター上の正方形アレイの7 μm ゴールドディスクからなる。アレイはほぼ600 μm 径の円形領域をカバーし、Si / SiO₂ / TiW / Au を含む一連の層から作製される基材上に厚さ0.35 μm の薄層のポリイミドを光パターン形成することにより達成される。7 μm の微小電極のアレイは、露出金属のキャパシタンスに伴ういかなる電気化学バックグラウンド電流からの寄与も抑えて、高い収集効率の電気活性種を与える。金属上に、PVA 層、たとえば、光形成性ポリビニルアルコールが含まれるとバックグラウンド電流の減少が著しく増強される。

10

【0067】

多孔質PVA層は好ましくは、ウェハ上の微小電極上にPVAとスチルバゾリウム (stibilizonium) 光活動性架橋剤の水性混合物をスピンコートすることにより調製される。スピンコート混合物は、場合によりウシ血清アルブミン (BSA) を含む。次に、PVA層は、アレイ上及びアレイ周囲の領域のみを覆うように光パターン形成されてもよく、好ましくは約0.2 ~ 1.0 μm、たとえば、0.4 ~ 0.8 μm 又は約0.6 μm の厚みを有する。異なるTSH抗体に対する免疫センサーは、ビーズ上に抗体を被覆し、ビーズをそれが接着するセンサー表面に塗布することにより作製してもよい。

【0068】

下記のビーズ調製法を使用して、脱イオン水中、約0.6 ~ 2.0 wt %、たとえば、約0.8 ~ 1.6 wt % 又は約1 wt % 固体を含む、約30 ~ 60 nL、たとえば、35 ~ 50 nL、又は約40 nL の液滴を、センサーを覆う光パターン形成された多孔質ポリビニルアルコール選択透過性層上に微粒分散させ (たとえば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,554,339号の方法及び装置を使用して)、乾燥させておいてもよい。乾燥した粒子は、その血液試料又は洗浄液への溶解を実質的に防ぐ多孔質層に接着するべきである。

20

【0069】

捕捉ビーズ製作

本発明のために使用される捕捉ビーズは、使用されるのが固定化された捕捉抗体のためでも任意のスカーベンジャービーズ抗体のためでも、種々の技法により形成することができる。好ましい実施形態では、抗TSH及び抗HSAで被覆されたカルボン酸修飾ラテックス微粒 (Bangs Laboratories Inc. 及びSeradyn Microparticles Inc. より市販されている) は両方とも同じ方法により調製される。粒子は好ましくは、先ず遠心分離によりバッファー交換され、続いて抗体が添加されて、これを粒子上に受動的に吸着させておく。次に、粒子上のカルボキシル基は好ましくは、たとえば、MESバッファー中のEDAC、pH 6.2で活性化され、抗体へのアミド結合を形成する。いかなるビーズ凝集体も遠心分離により取り除いてよく、完成ビーズは、たとえば、約-80 で凍結保存されてもよい。

30

【0070】

カートリッジ設計

図を参照すると、本発明において使用するための任意のカートリッジ設計は、カバー (図1、図2)、基部 (図4) 及び基部とカバーの間に配置された薄膜接着ガスケット (図3) を備えている。この時点で図1を参照すると、カバー1は、亀裂を生じることなく柔軟な蝶番部5、9、10で繰り返し変形することが可能な硬質物質、好ましくはプラスチックで作られている。カバーは蓋2を備え、この蓋は柔軟な蝶番9によりカバー本体に取り付けられている。実施中、試料の試料保持チャンバー34への導入後、蓋は試料入口4への入り口をしっかりと閉めて、試料漏出を防ぐことができ、蓋はフック3により固定される。カバーは、カバー本体に対して取り外し可能であり、柔軟な蝶番部5、10によりカバー本体に取り付けられている2つのヘラ6、7をさらに備えている。実施中、ポンプ手段の作用を受けると、ヘラ6は、薄層ガスケット21に覆われている空洞43を備える浮

40

50

袋に力を加えて液体をカートリッジの導管内に液体を移す。第2のポンプ手段による作用を受けると、ヘラ7はガスケット21に力を加え、ガスケットはそこに設けられた裂け目22及び23のせいで変形することができる。カートリッジは読取り装置への挿入のために改造されており、したがってこの目的のために複数の機械的及び電氣的接続を有する。カートリッジの手動操作が可能であることも明白であるべきである。したがって、カートリッジを読取り装置に挿入すると、ガスケットは、空洞42に位置しているほぼ130 μ Lの分析/洗浄溶液(「液」)で満たされた液体含有ホイルパック上に圧力を送り、スパイク38上でパッケージを破裂させて、液体を、基部において短い横断導管を介してセンサー導管に接続している導管39中に排出する。分析液は、毛細管ストップ(capillary stop)として機能するテーブガスケットの小開口上に先ず液体を押し付ける分析導管の前を満たしている。カートリッジに適用される分析器機構の他の動きを使用して、分析導管内の制御された位置で分析液中に1つ又は複数の空気部分を注入してもよい。これらの部分を使用して、最小限の液体でセンサー表面と周囲の導管を洗浄するのに役立つ。

10

【0071】

カバーは、柔軟な薄層8で覆われている穴部をさらに備えている。実施中、薄層にかけられる圧力は、ガスケットの小さな穴部28を通して導管20内に1つ又は複数の空気部分を排出する。

【0072】

図2を参照すると、基部の下面は、第2の導管11及び第1の導管15をさらに備えている。第2の導管11は狭窄部12を含み、この狭窄部は液体の流れに抵抗力を与えることにより液体流を制御する。任意の被覆13、14は疎水性表面を提供し、これらの被覆はガスケット穴部31、32と一緒に導管11、15間の液体流を制御する。基部の陥凹17は導管34において空気の経路を与えてガスケットの穴部27を通して導管34につながる。

20

【0073】

図3を参照すると、薄層ガスケット21は、基部及びカバー内の導管間の液体の移動を容易にし、必要な場合には圧力下でガスケットを変形させる様々な穴部及び裂け目を備えている。したがって、穴部24は液体を導管11から廃棄物チャンバー44に流してやることができ、穴部25は導管34と11の間に毛細管ストップを備えており、穴部26は陥凹18と導管40間で空気を流してやることができ、穴部27は陥凹17と導管34間に空気流動を与え、穴部28は、任意の閉じられる弁41を介して導管19から廃棄物チャンバー44に液体を流してやることできる。穴部30及び33は、それぞれカットウェイ35及び37内に収納されている免疫センサーチップ(上記)を導管15内の液体に接触させることができる。特定の実施形態では、カットウェイ37は接地電極及び/又は対基準電極を収納し、カットウェイ35は少なくとも1つの分析物センサー及び場合により伝導度センサーを収納する。穴部29は下のフィルターを外部空気供給に接近させ、洗浄液流動中に噴き出される気泡を生成させる。気泡の縁は、センサー上の部分的洗浄を果たす洗浄液にはっきりした変化を生じる。典型的なELISAアッセイは、捕捉センサーの効果的な洗浄を可能にするはっきりしたバッファー変化(部分的洗浄ではなく)を利用する。

30

40

【0074】

図3及び図4を参照すると、導管34は、ガスケット21の開口部122を介して試料入口4を組み立てられたカートリッジの第1の導管11に接続する試料保持チャンバーである。カットウェイ35は、分析物センサー(単数又は複数)又は分析物応答性表面を、任意の伝導度センサー(単数又は複数)と一緒に収納している。カットウェイ37は、必要な場合には電気化学センサーのためのリターン電流経路として接地電極を収納しており、任意の伝導度センサーをも収納していてもよい。カットウェイ36は、液体が第1と第2の導管間を通過できるようにガスケット穴部31と32間に流体経路を与える。陥凹42は、読取り装置内に挿入されるとヘラ7にかかる圧力のせいでスパイク38

50

により穴をあけられる液体含有パッケージ、たとえば、断裂可能ポーチを組み立てられたカートリッジに収納している。穴をあけられたパッケージから出る液体は39で第2の導管に流入する。浮袋はその上面をガスケット21により密封されている陥凹43を備えている。浮袋はポンプ手段の一実施形態であり、ヘラ6にかかる圧力により発動され、導管40中の空気を移動させそれによってこの試料を試料チャンバー34から第1の導管15に移動させる。

【0075】

空気が浮袋から試料チャンバーに入る位置（ガスケット穴部27）及び毛細管ストップ25を合わせて、試料チャンバーの既定の容積を規定する。いくつかの好ましい実施形態では、試料は1～500 μ L、たとえば、5～200 μ L又は10～50 μ L、好ましくは約20 μ Lの試料容積に計量される。この容積に一致する試料の量は、ヘラ6が押えられているときに第1の導管に移される。したがって、この配置は未計量試料の計量された量をカートリッジの導管内に送達するための計量手段の1つの可能な実施形態である。

10

【0076】

本カートリッジでは、試料セグメントを計量するための手段は、基部プラスチック部分において与えられる。セグメントサイズは基部のコンパートメントのサイズ並びにテープガスケットにおける毛細管ストップ及び空気パイプ穴部の位置により制御される。この容積は、1～500 μ L、たとえば、1～200 μ Lまで容易に変化させることが可能である。試料サイズのこの範囲の拡大は本発明の文脈内で可能である。

20

【0077】

液体は、センサー導管19でのその提示に先立って試料中への試薬を修正する（たとえば、スカベンジャービーズ、シグナル抗体又は可溶性分子のうちの1つ又は複数を用いて）のに使用することができる分析前導管11の中を押し通される。代わりに、修正試薬のうちの1つ又は複数は1つ又は複数の導管に位置していてもよい。たとえば、上記1つ又は複数の試薬は、部分16を超えて導管34及び/又は導管15に位置していてもよい。試料を分析前導管の中を押し進めることは、流体移動の発動に対するその応答性を軽減するダイアフラムポンプヘラ7に張力を導入するのにも役立つ。

【0078】

いくつかのアッセイでは、分析物の定量化が必要な場合は計量は有利である。廃棄物チャンバー44は、カートリッジの外面の汚染を防ぐために、導管から排出される試料及び/又は液体のために提供される。廃棄物チャンバーを外部の大気に接続する通気孔45も提供される。カートリッジの特色は、いったん試料が負荷されると、分析を完了することができ、試料に接触する操作員又はその他なしでカートリッジを破棄することができることである。

30

【0079】

この時点で図5を参照すると、51～57が、場合により試料又は液体を修正する乾燥試薬で被覆することができる導管及び試料チャンバーの一部である、カートリッジ及びコンポーネントの特色の回路図が提供される。試料又は液体を、それを溶解する乾燥試薬上を少なくとも1回は通過させる。カートリッジ内で試料又は液体を修正するのに使用される試薬は、抗体-酵素コンジュゲート、シグナル抗体、アッセイ化合物間の特異的若しくは非特異的結合反応のいずれかを防ぐブロッキング剤又は犠牲ビーズ（上記）を含んでもよい。可溶性ではないがアッセイ成分がカートリッジの内面に非特異的に吸着するのを防ぐのに役立つ表面被覆も提供することができる。

40

【0080】

試料又は液体のセグメント内では、修正物質を優先的に溶解させセグメントの既定の領域内に濃縮することができる。これはセグメントの位置と動きを制御することを通じて達成される。したがって、たとえば、先端など、セグメントの一部を修正物質上で交換しさえすれば、この物質の高局所濃度を先端近くで達成することができる。代わりに、物質の均一な分布が望まれる場合、たとえば、修正物質の既知の濃度が定量分析のために必要な場合、試料又は液体がさらに交換されると、混合され均一に分布することになる。

50

【0081】

特定の実施形態では、閉じられる弁58が第1の導管と廃棄物チャンバーの間に提供される。一実施形態では、弁58は不透過性物質で被覆されている乾燥スポンジ材を備えている。実施中、スポンジ材を試料又は液体に接触させると、スポンジが膨張して空洞41を満たし、それによって廃棄物チャンバー44への液体のそれ以上の流入を実質的に遮断する。さらに、濡れた弁は第1の導管と廃棄物チャンバー間の空気の流れも遮断し、これにより試料チャンバーに接続された第1のポンプ手段は液体を第2の導管に移し、液体を第2の導管から以下のようにして第1の導管内に移すことができる。試料は、制御された時間センサーに曝露された後、分析後導管19内に移動され、そこで試料を別の試薬により修正することができる。次に、試料をセンサーに戻すことができ、第2の反応期間を開始することができる。代わりに、分析後導管は試料部分をセンサーから分離するためだけに役立つことも可能である。

10

【0082】

図6は、3つのポンプ手段61~63を備えている免疫センサーカートリッジのレイアウト図を示す。これらのポンプは特定の実施形態に関して描かれているが、ポンプ手段61~63のそれぞれの機能を果たすことができるいかなるポンプ手段でも本発明内で使用することができることは容易に理解されるであろう。したがって、ポンプ手段1、61は試料を試料保持チャンバーから第1の導管へ移すことができなければならず、ポンプ手段2、62は液体を第2の導管内に移すことができなければならず、ポンプ手段3、63は少なくとも1つのセグメントを第2の導管に挿入することができなければならない。

20

【0083】

操作

好ましい実施形態では、第1ステップで、使用者は患者から試料を採血し（又は以下の場合のように、既知TSH濃度の対照液体を使用する）、数滴をカートリッジに挿入する。いったんカートリッジが計器に挿入されると、計器は検査サイクルの残りを制御する。シグナル抗体は好ましくは、試料中に溶解されてカートリッジ内の導管（たとえば、保持チャンバー）の壁に被覆されており、試料の一部はポンプにより免疫センサーの位置まで移動される。代わりに、シグナル抗体は免疫センサーの領域又は装置内の他の場所の、しかし理想的には免疫センサーの上流の位置の導管の被覆に配置されていてもよい。ポンプは試料を振動させて、センサー上でのサンドイッチ形成を促進するのにも役立つ。これには約1~20分、好ましくは2~14分、4~12分、又は理想的には約8分かかることがある。次に、ポンプは試料を廃棄物チャンバーに押し込む。別々の洗浄ステップを含む実施形態では、内部液体ポーチから出る洗浄液はポンプにより免疫センサー上に送られて、いかなる残余試料及び非結合シグナル抗体でも洗い流すことができる。液体の一部は、酵素基質も含有するが、センサー領域に残る。次に、免疫センサーで電流の測定が行われる。計器内のソフトウェアはその値、たとえば、実施例のセクションに表に示されている電流及び他のデータを記録する、又は実際の分析物濃度を計算し表示する。

30

【0084】

電流測定電気化学システムである、好ましい実施形態の操作中、ALPの活性から生じる免疫センサーでのp-アミノフェノールの酸化に伴う電流は分析器により記録される。様々なリン酸化基質のALP脱リン酸化の生化学は周知である。免疫センサーでの電位は、銀-塩化銀基準電極に対して平衡にされる。

40

【0085】

多くの種類の免疫アッセイ装置及び方法が記載されており、以下の共同所有の特許及び出願がある。血液試料中の分析物を首尾よく測定するための使い捨て感知装置は、米国特許第5,096,669号においてLaucksにより開示されている。この装置は、血液試料中の分析物濃度を測定する目的で、読取り装置及び読取り装置に収まるカートリッジを用いる。Millerらへの米国特許第7,723,099号は、免疫基準電極を備えた免疫アッセイ装置を記載しており、Millerらへの米国特許第7,682,833号は改良された試料閉鎖装置を備えた免疫アッセイ装置を記載しており、Campbell

50

1らへの米国特許出願公開第2004/0018577号は多重ハイブリッド免疫アッセイを記載しており、Davisらへの米国特許第7,419,821号は分析物測定及び免疫アッセイのための装置及び方法を記載しており、Collierらへの米国特許出願公開第2010/0167301号はヌクレオチドコンジュゲートを使用する免疫アッセイ組成物及び方法を記載している。これらの特許及び特許出願はそれぞれが参照によりその全体を本明細書に組み込まれる。

【0086】

免疫アッセイは様々な形態の干渉に感受性であることは当技術分野では周知である。たとえば、共同所有係属米国特許出願第12/411,325号(「325出願」)は、IgG試薬カクテルにIgMを含むことにより異好性抗体からの干渉を軽減することに取り組んでいる。「325出願」は参照によりその全体を本明細書に組み込まれる。

10

【0087】

低洗浄TSHアッセイのための抗体選択への経験的対理論的アプローチ

TSHアッセイでは、いくつかの臨床状況において、関連ホルモンはTSHと比べて潜在的に高いモル濃度で見出される。したがって、FSH、LH及びCGは典型的には、それぞれ500、500及び200,000mIU/mLのレベルでTSHアッセイに添加されて、高濃度の交差反応種の存在下で実試料をシミュレートする(Architect Product Data Insert, Abbott, Chicago, IL)。TSH、FSH、LH及びCGに対するこれらの濃度は、それぞれおよそ0.96、3000、760及び436,000pMである。

20

【0088】

理論的交差反応性

平衡解離定数は測定されると、得られた解離定数に基づいて予想される交差反応性を比較するために理論的計算を実施することができる。これらの計算は実際のアッセイの結果を正確に予測することはできないが、抗体の親和性がアッセイを実施するのに十分であり、選択された抗体が低洗浄カートリッジ実験において試験された場合に著しくより良い成績を挙げることを保証する指針として使用してもよい。これらの計算は、開発のプロトタイプ段階において思いがけないアッセイ結果を同定することによりアッセイの開発を支援することもできる。たとえば、下の表1を参照されたい。

【0089】

計算は、2ステップアッセイ並びに洗浄手順に先立って(1)捕捉ステップ及び(2)検出ステップを含む2ステップアッセイを想定することにより実施された。捕捉ステップでは、4種のホルモン全てが捕捉抗体と結合し平衡に達すると想定される。このステップ後捕捉抗体に結合しているそれぞれのホルモンの濃度は捕捉されたホルモンと見なされる。検出ステップでは、捕捉されたホルモンは検出抗体に結合する際に平衡に達すると想定される。この第2ステップ後に検出抗体に結合しているそれぞれのホルモンの濃度は検出された濃度である。次に、交差反応性は干渉ホルモンの検出された濃度をTSHの検出された濃度で割り100%を掛けることにより計算される。表8に与えられる抗体についての測定された解離定数は計算のために使用された。TSH、FSH、LH及びCGに対する濃度はそれぞれほぼ1、3000、760及び436,000pMである。これらの値は、典型的にはTSHアッセイにチャレンジするためにTSHアッセイに添加される値に匹敵する。この計算を使用して、選択された抗体が対照抗体よりも改善されたものであることを確かめる。計算は100pM捕捉抗体及び100pM検出抗体を想定している。

30

40

【0090】

モデルは、適合性抗体対を決定する又は捕捉抗体についての物質移行の影響などの他の要因として実際のアッセイにおける結果を正確に予測することはできないので、データは、抗体には利点があることを確かめ標的解離定数を見積もる指針として使用されるだけである。したがって、抗体を比較するために、交差反応性計算から決定される値は以下のようにして比較される。対照交差反応性値は、抗体TSH Ab544及び414Bを使用して上の計算を実施することにより定義される。これらの対照抗体について得られる交差

50

反応性の最良値は、改良しなければならない交差反応性であると解釈される。この値は、下の表 1 においてホルモンごとにアステリスク付きで示されている。いかなる候補抗体対も両方の構成におけるこれらの値よりも低い交差反応性を有するはずである。表のデータから、4 1 4 B と 5 4 0 9 の組合せは、F S H と C G に対する交差反応性が対照値を上回っている状態を有していることが分かる。この結果により、この組合せが T S H アッセイのための最良の対ではない可能性が示唆される。表は、5 4 0 9、M E 1 3 0 及び T 2 5 C の組合せが、全てのホルモンについて、どちらの組合せでも対照値を下回る交差反応性の値を生じること示している。これは、これらの抗体がアッセイにおいて使用するのに良好な候補である可能性があり、さらに調べられたことを示している。

【表 1】

10

捕捉 A b	シグナル A b	FSH	LH	CG
5409	ME130	0.04	0.01	40
ME130	5409	0.04	0.01	7.3
5409	T25C	0.02	0.01	75
T25C	5409	0.02	0.01	12
414B	5409	0.73	0.03	6
5409	414B	11	0.03	7800
対照				
TSH Ab 544	414B	145	0.74*	85,200
414B	TSH Ab 544	10*	0.79	120*

20

*は不十分なサンドイッチ抗体対を示している。

【0091】

本発明は、以下の非限定的実施例に照らしてさらによく理解されることになる。

【実施例】

【0092】

30

(例 1) : 初期抗体スクリーニング

67 の抗体調製物が得られ (表 2)、ニトロセルロースドットプロットアッセイを用いて試験された。さらに、T S H 抗体 5 4 4 及び S e r a d y n 抗アルファ L H モノクローナル抗体 (S e r a d y n、カタログ番号 M I T 0 4 1 4 B) は、これらの研究において抗体のベンチマーク交差反応対として使用された。アッセイ標準を与えるため、抗原 T S H (カタログ番号 T 9 2 6 5、S i g m a、S t . L o u i s、M O)、F S H (カタログ番号 F 4 0 2 1、S i g m a、S t . L o u i s、M O)、L H (カタログ番号 L 5 2 5 9、S i g m a、S t . L o u i s、M O)、及び C G (カタログ番号 C 0 4 3 4、S i g m a、S t . L o u i s、M O) は、T S H、F S H、L H 及び C G についてそれぞれおよそ 35,000 μ IU/mL、700,000 mIU/mL、250,000 mIU/mL、 2×10^7 mIU/mL の濃度まで 1/5 P B S バッファー中に再懸濁された。1 μ L のそれぞれの抗原は、ニトロセルロースの薄片上にスポットされ乾燥された。ニトロセルロース片は先ず P B S 中 1% 粉末ミルクで遮断され、次に個々の薄片は異なる抗体調製物のそれぞれと一緒にインキュベートされた。次に、薄片は P B S、0.05% T w e e n - 2 0 で洗浄され、続いてヤギ抗マウス I g G H + L A L P 二次コンジュゲート (カタログ番号 4 7 5 1 - 1 8 0 6、K i r k e g a a r d & P e r r y、G a i t h e r s b u r g、M D、U S A) が添加され、必要な場合にはある種のポリクローナルには抗ウサギ、ヒツジ及びヤギ I g G H + L A L P コンジュゲートが使用され、次に B C I P / N B T アルカリホスファターゼ基質 (1 - 成分) (カタログ番号 5 0 - 8 1 - 0 7、K i r k e g a a r d & P e r r y、G a i t h e r s b u r g、M D、

40

50

U S A) が添加された。反応は脱イオン水中ですすぐことにより停止された。

【表 2 - 1】

表 2 スクリーニングされた抗体の一覧	
供給メーカー	カタログ番号
Immunoreagents	MuxHu-012A-Q
	MuxHu-012B-Q
	MuxHu-012C-C
	GtxHu-012-D
Maine Biotechnology Services	MAB128P
	MAB129P
	MAB130P
	MAB131P
	MAB132P
Biospecific	5405
	5409
	G-109-C
	S-109-C
	5401
Hytest	5403
	5404
	抗-h TSH 11E4
	抗-h TSH 7G12
Santa Cruz Biotech	抗-h TSH 10C7
	抗-h TSH 5E8
	抗-h TSH TSB1
	抗-h TSH TSB4
	sc-7813
	sc-7814
Seradyn	sc-7815
	sc-28917
	M1T0401
	M1T0406
Meridian Life Sciences	M1T0409
	M1T0412
	M1T0414
	MAT04-004 クローン 057-11004
	MAT04-410 クローン 204-12410
	MAT04-176 クローン 090-11176
	MAT04-127 クローン 090-10127
MDT04-005 クローン 057-11005	
MAT04-005 クローン 057-11005	
MAT04-252 クローン 204-12252	
MAT04-006 クローン 057-11006	

【表 2 - 2】

	MAT04-003 クロ-ン 057-11003	
	MCT04-001 クロ-ン 057-11001	
ThermoScientific Pierce	MA1-82908	
	MA1-82909	
	MA1-83492	
Immunoreagents	GtxHu-012-D	
	ShxHu-012-D	
Biospecific	G-109-C	10
	S-109-C	
Abd Serotec	8920-0456	
	8920-0600	
	8920-0609	
	0200-0064 クロ-ン 154	
	0200-0065 クロ-ン 155	
	8926-0511	
Meridian Life Sciences	D92409G	
Chromaprobe	UHS115	
AbCam	ab9390 ME-130	20
	ab1989 ME-128	
	ab9239 ME-131	
Fitzgerald	10C-CR2151M3	
	10C-CR2151M4	
	10C-CR2151M5	
	10C-CR2151M6	
	10-T25D	
	10-T25A	
	10R-T128A	
	10-T15A	
	10-T15B	30
	10-T15C	
	10-T25B	
	10-T25C	

【 0 0 9 3 】

追加の評価のために選択された抗体は、T S H 抗原とは良好なシグナルを、且つ F S H、L H 及び C G とは低シグナルを示す小片を同定することにより決定された。これにより、対照として T S H A b 5 4 4 及び S e r a d y n M I T 0 4 1 4 B を含む、追加の評価のための 2 5 の候補抗体 (表 3) が得られた。

【表 3】

表 3 追加の交差反応性分析のための候補抗体 供給メーカー		ID
Abbott Diagnostics Division		TSH Ab 544
Seradyn (Thermo-Fisher)		MIT0414B
	Hytest	5E8
	Hytest	7G12
	Abd Serotec	8920-0600
	Abd Serotec	0200-0064
Meridian Life Sciences		MAT04-127
Meridian Life Sciences		MAT04-252
	Abcam	ME-128
Thermoscientific Pierce		MA1-82908
	Abcam	ME-130
	Abcam	ME-131
	Biospacific	5404
	Biospacific	5409
	Fitzgerald	10-T25B
	Fitzgerald	10-T25C
	Fitzgerald	10C-CR2151M3
	Fitzgerald	10C-CR2151M4
	Fitzgerald	10-T25D
	Fitzgerald	10-T25A
	Fitzgerald	10R-T128A
	Fitzgerald	10-T15A
	Fitzgerald	10-T15C
	Fitzgerald	10C-CR2151M5
	Fitzgerald	10-T15B

10

20

30

【0094】

次に25の候補抗体を使用して、下の例10、11に記載されている捕捉ビーズとALPコンジュゲートとの両方を作製した。これらの試薬はi-STAT（登録商標）カートリッジに組み込まれ、次に本明細書に記載される検査サイクルを使用して交差反応性についてスクリーニングされた。抗原（対照検査液）の濃度はTSH（ThermoFisher、カタログ番号ABT0315）、FSH、LH及びCGについてそれぞれおよそ0.4mIU/L、500mIU/L、500mIU/L及び200,000mIU/Lであった。FSH、LH及びCG試薬は、上記と同じ供給源であった。アッセイは、TSH単独を用いて、並びにTSHとそれぞれCG、FSH及びLHを個々に組み合わせて実施された。パーセント交差反応性は、TSH単独により生じるシグナルで割るTSHシグナルそれ自体を差し引いて、交差反応抗原のうちの1つと一緒にTSHから生じる電気化学シグナル間の差により計算された。

40

【0095】

このスクリーニングにより追加の評価のための4つの候補抗体が得られた（表4）。TSH Ab 544及びMIT0414B抗体は、高交差反応対照として比較研究のために使用された。最も低い相対的交差反応性を有する抗体からの供給メーカー提供のデータは表4に収載されている。これらは使用された抗原試料と最も低いレベルの交差反応性を有していたことに注目すべきである。これらの抗原は微量のTSH抗原を含有しており、さらに純度の高い抗原（Fitzgerald、North Acton、MAより購入）が使用された後の実験では見られなかったさらに高いレベルの交差反応性が観察された

50

ことは、Abbott Architect i2000SR機器 (Chicago, IL, USA) を使用してこれらの干渉抗原を試験することにより後に同定され確認された。交差反応性レベルは試験されたその他の抗体と比べて低かったので、これらの抗体は最良の交差反応性能を有すると予想され、下に記載される他の技法によりさらに分析された。

【表4】

会社	カタログ番号	種	種類	クローン	免疫原	エピトープ	Ka (L/モル)
AbCAM	ME-130 (ME130)	Mus	mAb IgG1	Ab9390	完全長ヒト TSH	ベータ TSH	2×10^{10}
Fitzgerald	10C- CR2151M4 (M4)	Mus	mAb IgG1	157155	ヒト下垂体 TSH	TSH	2×10^{10}
Fitzgerald	10-T25C (T25C)	Mus	mAb IgG1	M94206	ヒト下垂体 TSH	ベータ TSH	2×10^{10}
Biospecific	5409 SPTNE-5 (5409)	Mus	mAb IgG1	N/A	N/A	TSH	9.3×10^8

10

20

【0096】

(例2) : FRETエピトープマッピング

抗体対適合性は、フェルスター共鳴エネルギー転移 (FRET) ベースの競合アッセイにより決定された。およそ500~1000 μgのそれぞれの内分泌糖タンパク質ホルモン (TSH (カタログ番号T9265、Sigma、St. Louis、MO)、FSH (カタログ番号30R-AF020、Fitzgerald、North Acton、MA)、LH (カタログ番号30-AL15、Fitzgerald、North Acton、MA) 及びCG (カタログ番号30R-AC048、Fitzgerald、North Acton、MA)) は、Alexa-Fluor (登録商標) 488カルボン酸サクシニミジルエステル (カタログ番号A20100、Invitrogen、Carlsbad、CA) で標識された。抗体は、蛍光消光部分としてBHQ-10カルボン酸サクシニミジルエステル (カタログ番号BHQ-10S、Biosearch Technologies、Inc.、Novato、CA) で標識された。タンパク質はRuanaら (2009、Analytical Biochemistry、vol 393 : 196) に従って標識された。

30

【0097】

抗体対は非標識抗体の存在下でのその消光力に基づいて選択された。過剰量の6つの抗体は、先ず蛍光標識された抗原と一緒にインキュベートされ、次にそれぞれの試料は6個の試験管に分割された。6個の試験管では、6つのBHQ標識抗体のうち1つが添加された。したがって、表5に示されるように6×6の反応マトリックスが作製された。それぞれの試験管からの蛍光強度が、BHQ標識抗体を添加する前と後で測定された。蛍光強度が著しく変化すれば、陽性サンドイッチ対合であることが示された。蛍光強度が変化しない又はほとんど変化しなければ、同一分析物へのBHQ標識抗体の結合を遮断する非標識抗体が存在することが示された。蛍光は同一対について1.0の値に正規化された。表5は相対的蛍光値を与えている。

40

【表5】

		5409	T25C	ME130	M4	TSH Ab 544	414B
非標識抗体	5409	1*	0.78	0.78	0.90*	0.93*	0.88*
	T25C	0.95*	1*	0.97*	0.92*	0.97*	0.97*
	ME130	0.82	0.88*	1*	0.77	0.82*	0.99*
	M4	0.94*	0.74	0.76	1*	0.98*	0.90*
	TSH Ab 544	0.96*	0.71	0.72	0.92*	1*	0.89*
	414B	0.81	0.76	0.86*	0.75	0.83*	1*

*は不十分なサンドイッチ抗体対を示している。

【0098】

(例3) : i - S T A T (登録商標) カートリッジを用いたエピトープマッピング

6つの抗体ごとにポリスチレンビーズとALPコンジュゲートの両方が作製された(例2に記載されている)。カートリッジは、電気化学的電流(nA)を発生する0.4mIU/L TSH(組換えTSH、ThermoFisher、カタログ番号ABT0315、Fremont、CA、USA)を用いて試験された。表6は適合性抗体対を示すいくつかの抗体対を収載している。同一の抗体対組合せは試験されなかった。たとえば、414Bは、結合の生物学のせいで高交差反応性を有すると予測されるアルファサブユニットを認識し、カートリッジでは試験されなかった。抗体を蛍光タグ又は蛍光消光部分のどちらかで標識することによりエピトープ遮断の可能性があり、特にBHQ標識5409及びM4と一緒にT25Cについて、FRETとサンドイッチELISA法の両方間の差を説明することができることは認識されるべきである。抗体対は、30mIU/L濃度でのTSH抗原を使用するi-SSTATカートリッジの電気化学免疫アッセイシステムにおいて試験された。表6の値は、測定された電流をnAで表示している。

【表6】

		5409	T25C	ME130	M4	TSH Ab 544	414B
捕捉抗体	5409	NT*	34.59	53.64	15.19*	1.41*	NT*
	T25C	49.71	NT*	0.68*	40.90	0.83*	0.82*
	ME130	54.66	-0.10*	NT*	50.53	10.76*	NT*
	M4	20.67*	22.52	39.92	NT*	0.00*	NT*
	TSH Ab 544	7.98*	22.43	34.85	0.11*	NT*	25.0
	414B	40.29	NT*	NT*	41.27	10.15*	NT*

*は不十分な抗体対を示す。

NT = 試験されず

【0099】

交差反応性評価のための抗体対は、FRET競合アッセイ及びi-SSTAT(登録商標)カートリッジデータに基づいて表7に収載されている。

【表 7】

表 7 追加の評価のための考えられる抗体対	
捕捉	シグナル
5409	T25C
5409	ME130
T25C	5409
T25C	M4
ME130	5409
ME130	M4
M4	T25C
M4	ME130
TSH Ab 544	T25C
TSH Ab 544	ME130
TSH Ab 544	414B
414B	5409
414B	M4

10

【0100】

20

(例 4) : K_d 計算

およそ 500 ~ 1000 μg のそれぞれの内分糖タンパク質ホルモン (TSH (カタログ番号 T9265、Sigma、St. Louis、MO)、FSH (カタログ番号 30R-AF020、Fitzgerald、North Acton、MA)、LH (カタログ番号 30-AL15、Fitzgerald、North Acton、MA) 及び CG (カタログ番号 30R-AC048、Fitzgerald、North Acton、MA)) は、Alexa-Fluor (登録商標) 488 カルボン酸サクシニミジルエステル (カタログ番号 A20100、Invitrogen、Carlsbad、CA) で標識された。抗原は、蛍光消光部分として BHQ-10 カルボン酸サクシニミジルエステル (カタログ番号 BHQ-10S、Biosearch Technologies、Inc.、Novato、CA) でも標識された。タンパク質は Ruanら (2009、Analytical Biochemistry、vol 393:196) に従って標識された。

30

【0101】

およそ 100 ~ 250 nM 濃度の BHQ コンジュゲート抗体の、Alexa-Fluor (登録商標) 488 標識抗原のそれぞれの TSH では 100 pmol から LH、CG 及び FSH での約 1000 pmol と一緒の添加は、Ruanら (2009、Analytical Biochemistry、vol 393:196) に従って SLM-Aminco Model SLM8100 分光蛍光計を使用して実施された。データは IDL ソフトウェア (ITT、Boulder、CO) を用いて解析され、K_d 値 (nM) を得た。データの例は図 7 に見られる。K_d データの要約は表 8 に見られる。ME130、M4 及び 414B は表 9 及び 11 の抗体特徴を有しておらず、したがって、低レベルの交差反応性を示していない。表 8 は、4 つの異なる抗原を使用して 6 つの抗体についての K_d 結合データを提供しており、値は全て nM である。

40

【表 8】

抗体	表 8			
	TSH	FSH	LH	CG
5409	0.1	1000	1000	500
T25C	0.08	300	35	40
ME130	0.04	70	54	45
M4	0.18	210	300	554
TSH Ab 544	1.31	1000	1000	210
414B	0.04	0.1	0.05	0.05

10

【0102】

交差反応性レベルは低シグナルではさらに高いので、抗体が十分なシグナルを発生することが重要である。したがって、表9において十分に低いKd値のない抗体（TSHに対して高親和性）は交差反応性については検討されなかった。これにより、交差反応性試験について考えられる抗体対の新たな一覧が得られた（表10）。

【表 9】

表 9 低交差反応性を生成する 好ましい抗体TSH結合特徴	
捕捉/シグナル 抗体	Kd TSH (nM) ≤0.15

20

【表 10】

表 10 十分なTSH抗原親和性を有する 残りの考えられる抗体対	
捕捉	シグナル
5409	T25C
5409	ME130
T25C	5409
ME130	5409
414B	5409

30

【0103】

表11に見られる抗体Kd特徴を有する抗体は低交差反応性を有すると予想された。

40

【表 11】

表 11 低交差反応性を生成する 好ましい抗体特徴			
	Kd FSH (nM)	Kd LH (nM)	Kd CG (nM)
捕捉抗体	>1000	>1000	>500
シグナル抗体	>250	>35	>35

50

【0104】

(例5) : i - S T A T (登録商標) 交差反応性データ

コンジュゲート抗体ビーズ調製物及びアルカリホスファターゼ (A L P) コンジュゲートの組合せは i - S T A T (登録商標) 免疫アッセイカートリッジに組み込まれた。

【0105】

適合性抗体対 (表7)、T S H に対する適切な K d 値 (表9) 並びに F S H、L H 及び C G に対する高 K d 値 (表11) に基づいて、表10の組合せが例1に記載される交差反応性について試験され、表12にまとめられている。干渉抗原のいずれについても5%を超える交差反応性を示す抗体対はアステリスク (*) で示された。5409 (捕捉抗体) 及び T 2 5 C (シグナル抗体) のみが、表9及び11に記載される特徴を有する唯一の抗体なので、5%未満の交差反応性を示した。

10

【0106】

捕捉として使用された5409と検出抗体として使用されたT25Cの抗体組合せは、適合性エピトープを認識するその能力と共に、その抗原結合特徴のせいで低交差反応性を与えることができる唯一の対であった。ME130はTSHに対してより良好な結合親和性を有し、これはより高い電流測定電流発生で示された。より高い電流測定シグナルを示す抗体は、システムのノイズから区別するのにより多くの問題をはらむより低い電流測定シグナルを発生する抗体対と比べて生じる交差反応性は低かった。表12は、0.4 m I U / L T S H を使用し、抗原濃度の全てを添加する i - S T A T (登録商標) カートリッジフォーマットにおいて抗原交差反応性を示している。以前決定された適合性抗体対のみが選択された。M4は、TSHに対して親和性が不十分で他の抗体組合せと比べてカートリッジアッセイにおいて低シグナルを発生していたので、選択からは取り除かれた (表6及び表8)。

20

【表12】

表12				
捕捉A b	検出A b	FSH CR (%)	LH CR (%)	CG CR (%)
5409	ME130*	2.43*	10.08*	0.78*
5409	T25C	0.65	3.76	0.96
T25C	5409*	6.25*	9.89*	13.72*
ME130	5409*	3.90*	11.05*	11.84*
414B	5409*	260.5*	347.64*	84.6*
対照				
414B	TSH Ab 544*	219.21*	467.21*	39.17*
94544	414B*	7.15*	11.75*	117.14*

30

*は5%を超える、より望ましくない交差反応性を有する対を示している。

【0107】

(例6) : 抗 F S H 9 5 7 8 4 ビーズ調製

抗 F S H 9 5 7 8 4 ビーズは以下の通りに調製された。15 mg の 1 . 0 1 μ m カルボキシル化されたポリスチレン微粒子 (10%重量/容積) (パーツ番号 P C O 4 N、B a n g s L a b o r a t o r i e s I n c .、U S A) を 2 5 m M の 2 - (N - モルフォリノ) エタンスルホン酸 (M E S バッファー、p H 6 . 2) 中 1 . 2 m g の 抗 F S H 9 5 7 8 4 と 1 5 分間反応させ、次に遠心分離して上澄みを取り除いた。25 m M の M E S バッファー中にペレットを再懸濁させた後、10 m M のカルボジイミド (E D A C) を試料に添加し 4 で 2 時間反応させた。これに続いて、試料を遠心分離し、ペレットを 1 / 5 生理リン酸緩衝液で 2 度洗浄した。0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含むリン酸緩衝液中 1 0 % 固体で処方された試料は、さらに使用するために保存された。

40

【0108】

これらのビーズは、T S H 捕捉抗体が F S H コンジュゲートビーズで置き換えられてい

50

る F S H 検出カートリッジの組立てに使用された。ビーズは、25%タンパク質安定化溶液（カタログ番号 Q 2 0 3 0 5 2 9 P 1、Gwent Group、Pontypool、United Kingdom）を含む、1/5生理リン酸緩衝液中3.2%固体に処方された。0.08% Tween 20 中0.8%固体、0.8%タンパク質安定化溶液の処方チップ上にプリントされ、F S H カートリッジに組み込まれた。

【0109】

およそ5~10mg/mL（又は0.5~1%固体）のF S H ビーズは、およそ500mIU/mL F S H を含有する試験試料内にスパイク（spike）され、ピペットを用いて垂直に混合され、直ちにF S H 検出カートリッジの試料入口に注入された。ビーズはカートリッジの試料入口上にプリントし、後で試料がカートリッジ内に導入される際に試料中に溶解させることもできる。

10

【0110】

（例7）：LHビーズ調製

LHポリスチレンビーズは、抗F S H 95784の代わりにBiospecific LH5304抗体が使用される以外は、上の例6と同様に調製された。さらに、上の例6と同じように、これらのビーズを使用してLH検出カートリッジを作製した。

【0111】

（例8）：F S H 磁気ビーズ調製

F S H 磁気ビーズは以下の通りに調製された。15mgの0.70μm超常磁性微粒子（10%重量/容積）（カタログ番号MC04、Bangs Laboratories Inc、USA）は、50mMの2-（N-モルフォリノ）エタンスルホン酸（MESバッファー、pH6.2）中30mMのカルボジイミド（EDAC）と遠心管において15分間反応させた。この管は磁石上に置かれて、磁石の側に磁気ビーズを引き付け、上澄みは外に吸引した。50mMのMESで2回洗浄後、1.2mgの抗F S H 95784（Abbott Diagnostics Division）は4で90分間ビーズと反応させた。ビーズは磁石を遠心管の横に置くことにより上澄みと分離され、次に上澄みは取り除いた。これに続いて、ペレットを1/5生理リン酸緩衝液で2回洗浄した。0.05% Tween 20 を含むリン酸緩衝液中5%固体で処方された試料はさらに使用するために保存された。

20

【0112】

およそ5~10mg/mL（又は0.5~1%固体）のF S H ビーズは、およそ500mIU/mL F S H を含有する試験試料内にスパイクされ、ピペットを用いて垂直に混合され、直ちにカートリッジ試料入口に注入された。ビーズはカートリッジの試料入口上にプリントし、後で試料がカートリッジ内に導入される際に試料中に溶解させることもできる。

30

【0113】

（例9）：LH磁気ビーズ調製

LH磁気ビーズは、抗F S H 95784の代わりにBiospecific LH5304モノクローナル抗体が使用される以外は、上の例8と同様に調製された。

【0114】

（例10）：T S H ビーズ調製

T S H 5409ANAビーズは以下の通りに調製された。15mgの0.2μmカルボキシル化された微粒子（10%重量/容積）（パーツ番号13000550100390、Seradyn、Indianapolis、IN、USA）を25mMの2-（N-モルフォリノ）エタンスルホン酸（MESバッファー、pH6.2）中1.2mgのT S H 5409mAbと15分間反応させ、次に遠心分離して上澄みを取り除いた。25mMのMESバッファー中にペレットを再懸濁させた後、10mMのカルボジイミド（EDAC）を試料に添加し4で2時間反応させた。これに続いて、試料を遠心分離し、ペレットを1/5生理リン酸緩衝液で2回洗浄した。タンパク質安定化溶液（カタログ番号 Q 2 0 3 0 5 2 9 P 1、Gwent Group、Pontypool、United

40

50

Kingdom)を含む1/5生理リン酸緩衝液中3.2%固体で処方された試料は、さらに使用するために保存された。これらのビーズは、TSHカートリッジを築くのに使用されるチップ上にプリントされた。

【0115】

TSH基準ビーズ調製は以下の通りであった。この方法は、反応において5409mAbの代わりに抗HSA抗体(HyTast Ltd、カタログ4T24 Mab 1C8、Joukahainenkatu、Turku、Finland)を使用する以外は5409ANAビーズ方法と同じであった。免疫センサー製造及び操作における基準ビーズの使用は米国特許第7,732,099号に記載されており、特許文献の全体は参照により本明細書に組み込まれる。ここでは、免疫基準センサーを使用して、免疫センサーへのシグナル抗体の非特異的結合から生じるシグナルを減算する。

10

【0116】

(例11A): TSHシグナル抗体コンジュゲート合成

シグナル抗体コンジュゲート合成の好ましい実施形態は以下の通りである。TSH T25Cコンジュゲート調製は、ペプシン消化T25C全抗体を使用して、0.1Mクエン酸バッファー(pH3.5)中37でT25CF(ab)2'を作製した。T25CF(ab)2'画分の精製は、S-300サイズ排除カラム(GE Healthcare、SE-75184 Uppsala、Sweden)を使用することにより実行された。塩酸モノエタノールアミン(MEA)を使用して、T25CF(ab)2'をFab-SHに還元し、次にこれをLC-SMCC(サクシニミジル-4-[N-マレイミドメチル]クロロヘキサン-1-カルボキシ-[6-アミドカプロン酸])及び活性化された単分子ALP(アルカリホスファターゼ)と4で一晩反応させた。次に、サイズ排除カラムを使用して、コンジュゲート画分を精製し、それを1/5生理リン酸緩衝されたタンパク質安定化溶液中に処方した。次に、これはさらに使用するために-80で凍結保存された。

20

【0117】

(例11B): LH及びFSHシグナル抗体コンジュゲート合成

FSH及びLH実験では、アルファサブユニットを認識する414B抗体は上の例11Aに記載されるT25Cで置き換えられた。この抗体は検出抗体としてスカベンジャービーズ実験のために使用された。

30

【0118】

(例12): スカベンジャー又は犠牲ビーズ

スカベンジャービーズアプローチの有用性は図9~図11に示されている。図9に示されるように、ポリスチレンビーズを使用すると、FSH干渉は100%を超える交差反応性から15%未満に著しく減少した。図9は、FSHビーズ(例6)がFSH検出カートリッジに組み込まれている実験である。試料は極度に高濃度(500mIU/mL)のFSHを含有している。FSHスカベンジャービーズを添加していないシグナルは100%の値を割り当てられた。FSHスカベンジャービーズを添加後、シグナルは15%まで減少した。

40

【0119】

図10は、例7からのLHスカベンジャービーズの影響に焦点を合わせている。例7及び11Bに記載される抗体組合せLH捕捉と414Bでは、LH交差反応性はスカベンジャービーズなしでは100%であり、アッセイサイクルにスカベンジャービーズを添加すると干渉は4%まで減少する。

【0120】

前述の例では、LH抗体はモノクローナル抗体ムス属ベータLH、カタログ番号5304SP-5であった。およそ0.5mg/mLのビーズが使用された。FSH mAbは抗FSH 95784SP-5であった。下の表13は、本発明のこの実施形態に従ってスカベンジャービーズとして用いてもよい様々な市販の物質に関する追加の情報を提供している。

50

【表 1 3】

会社	カタログ 番号	種	種類	クローン	免疫原	エピトープ	用途
Biospacific	抗FSH 95784 SP- 5	マウス	mAb IgG1	N/A	N/A	ベータ FSH	スカベンジャー
Biospacific	5304 SP-5	マウス	mAb IgG1	N/A	N/A	ベータ LH	スカベンジャー
Seradyn	MIT0414B	マウス	mAb IgG1	BB3.1.3	ヒト 黄体化 ホルモン	アルファ サブユニット	シグナル
Abbott Diagnostics Division	95784	N/A	N/A	N/A	N/A	ベータ FSH	スカベンジャー

10

【0121】

20

図 1 1 は、磁気ビーズを用いることにより、FSH 交差反応性が約 100% から 10% 未満まで著しく減少することが示されている。この実験では、FSH ポリスチレン捕捉ビーズを含有する FSH 検出カートリッジが構築され（例 6）、図 8 に示されるように、ニッケル被覆（ Nd_2Fe_4B ）永久磁石がカートリッジに組み込まれた。その上、超常磁性 FSH スカベンジャービーズ（例 8）は試料吸気口上にプリントされた（図 5、試料入口）。これらのコンポーネント変更を用いて、カートリッジは、標準手順のように構築された。実験は、500 mIU/mL の FSH をスパイクされた、およそ 20 μ L の Abbott Architect 0 TSH カリプレーター（Chicago、IL）試料を添加することにより実施された。

【0122】

30

分析者は、カートリッジを用いてアッセイにおけるステップを実施し、アッセイにおいて発生し得られた電流は、スカベンジャービーズなしのカートリッジ試験について 100% に変換され、スカベンジャービーズがカートリッジにプリントされている試料はスカベンジャービーズなしの結果に基づいて計算され、シグナルの著しい減少が示され、スカベンジャービーズがアッセイにおいてバックグラウンドを減少させる能力が確かめられた。

【0123】

（例 1 3）：代替モノクローナル抗体を求めるためのスクリーニング

別の実施形態として、11 の抗体調製物が、T25C 及び / 又は 5409 抗体の潜在的代替物として Abbott Diagnostic Division (ADD) の TSH 抗体細胞系のストックから得られた。T25C 及び / 又は 5409 抗体に取って代わる潜在的代替モノクローナル抗体を求めるためのスクリーニングアプローチは、同じエピトープが特徴付けられていない抗体で見つかるのであれば、それらは T25C 及び / 又は 5409 抗体に類似する特性を潜在的に有するはずであるという仮説に基づいていた。

40

【表 1 4】

供給メーカー	ID	A b エピトープ
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-542-594	N/A
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-1064-137	5409
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-1332-190	N/A
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-541-173	N/A
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-518-308	5409
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-880-320	5409
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-755-148	5409
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-1179-456	T25C
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-266-130	5409
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-529-114	5409
Abbott Diagnostics Division	クローン 10-542-219	N/A

10

【 0 1 2 4 】

およそ 0.1 μg の ADD TSH 全 mAb 候補は 39 mIU/L TSH 試料と一緒にスパイクされ、よく混合され、捕捉抗体として 5409 を、且つ標識抗体として T25C を用いる i-STAT (登録商標) 免疫アッセイカートリッジで試験された。2つの抗体クローン、10-518-308 及び 10-1179-45 (表 1 4) は検出シグナルの著しい減少を示し、これらのクローンが 5409 又は T25C 抗体のどちらかと競合していることが示された。

20

【 0 1 2 5 】

抗体クローン 10-518-308 及び 10-1179-45 が 5409 及び / 又は T25C の潜在的代替物として同定されると、次の試験ステップはこれらのモノクローナル抗体からビーズとコンジュゲートとを作製し、それらが使用可能なサンドイッチ (適合性抗体エピトープ対) を形成するかどうかを判定し、TSH について良好なシグナルを、FSH、LH 及び CG に対して良好な選択性を示すかどうかを判定することであった。

30

【 0 1 2 6 】

ADD TSH 抗体 10-518-308 は ANA ビーズにされ、センサーの上にプリントされ、コンジュゲートなしのカートリッジに組み込まれた。ADD TSH 10-1179-45 は F(ab)2' に消化され、Fab 断片にされ、さらに ALP とコンジュゲートされてカートリッジ検査のためのコンジュゲートを形成した。5409 ANA 及び T25C コンジュゲートは性能比較のために対照として使用された。評価における以下のステップのためには 4 つのカートリッジ組合せが存在する。

【表 1 5】

組合せ番号	ANA ビーズ	コンジュゲート
1	5409	T25C
2	5409	10-1179-45
3	10-518-308	T25C
4	10-518-308	10-1179-45

40

【 0 1 2 7 】

これら 4 つのサブロットのカートリッジ (表 1 5) は、感度及び線形評価のために、0.1、0.4、0.6、1、8、45、88 mIU/L レベルで裸の TSH プラズマを含

50

む一連のTSH自社製対照に対して試験された。これらのカートリッジは、交差反応性評価のために0.4mIU/L TSH試料中500mIU/mLでスパイクされたLH、FSH及び200000mIU/mLでスパイクされたCGに対しても試験された。

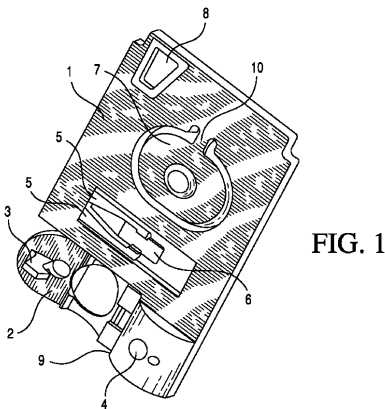
【0128】

上の試験に基づいて、TSH抗体クローン10-1179-456は、Fitzgerald T25C抗体に取って代わって抗体Biospacific5409と対を形成する潜在的候補であることが確かめられた。なぜならば、この組合せはTSHに類似するシグナル応答、並びにT25C/5409組合せと比べてLH、FSH及びCG交差反応物と10%未満の交差反応性を有するからである。

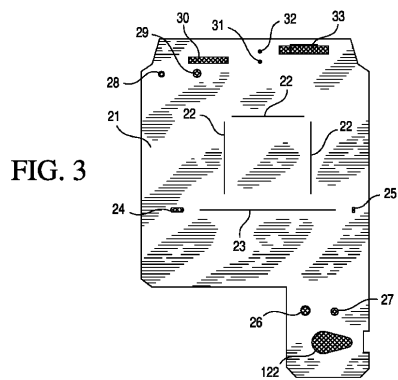
【0129】

本発明は様々な好ましい実施形態の点から説明されてきたが、当業者であれば、本発明の精神から逸脱することなく様々な修正、置換、省略及び変更を加えることができることは認識されるであろう。したがって、本発明の範囲は以下の特許請求の範囲のみによって限定されることが意図されている。

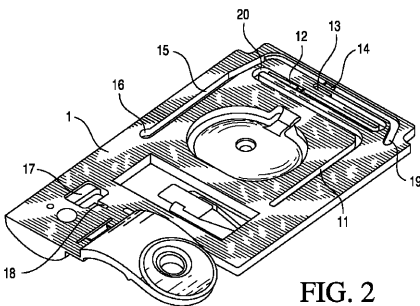
【図1】



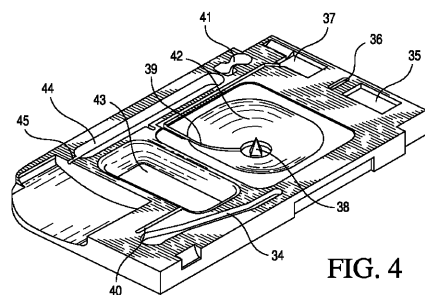
【図3】



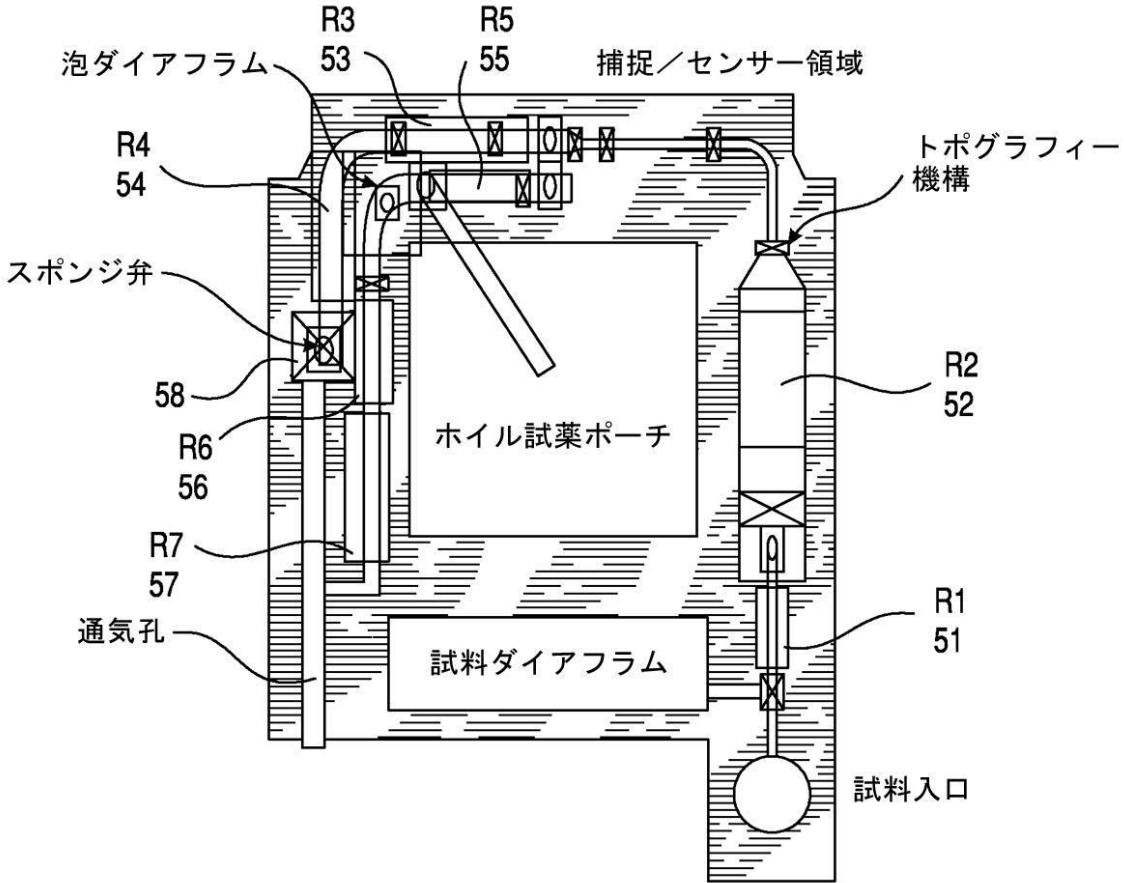
【図2】



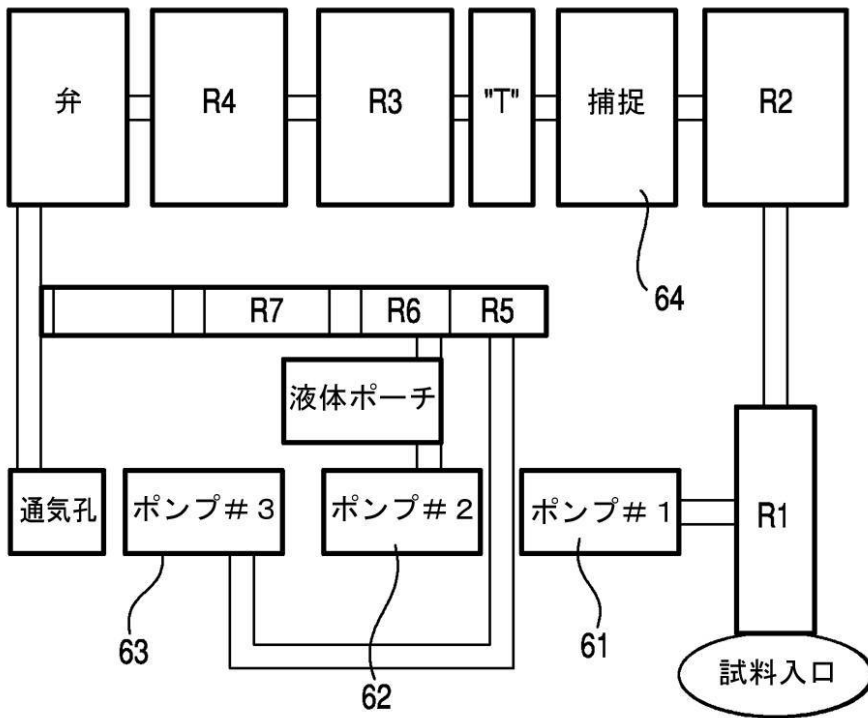
【図4】



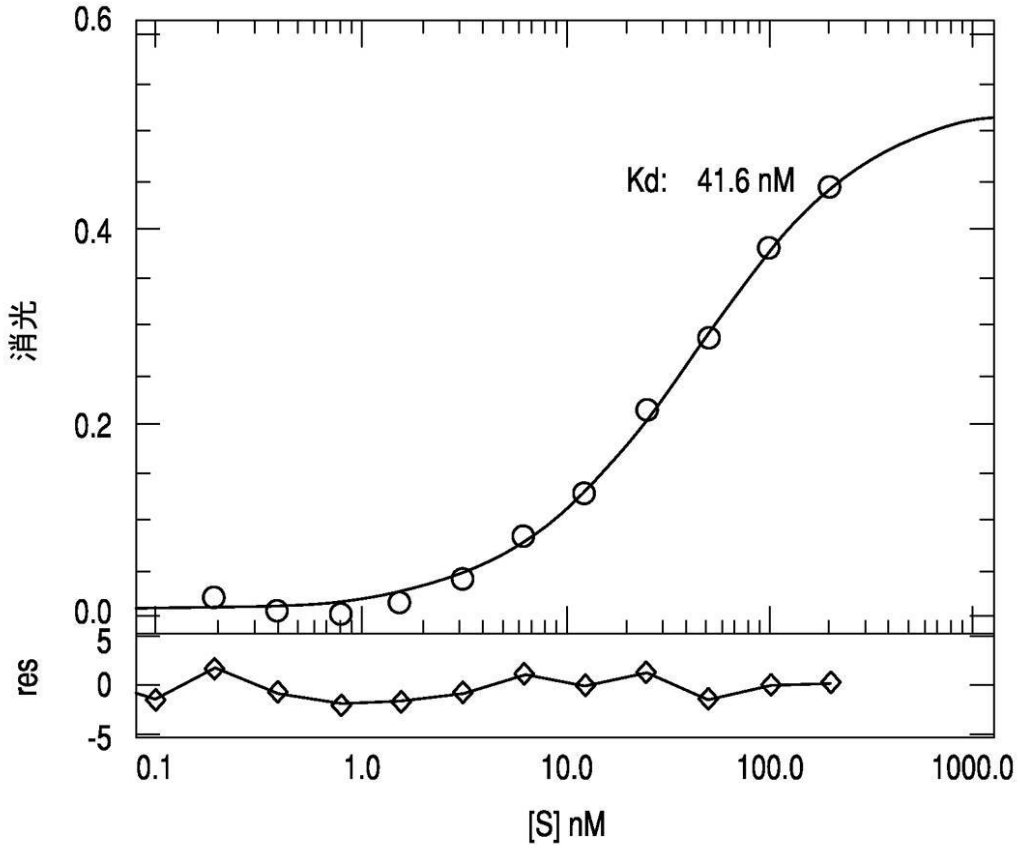
【 図 5 】



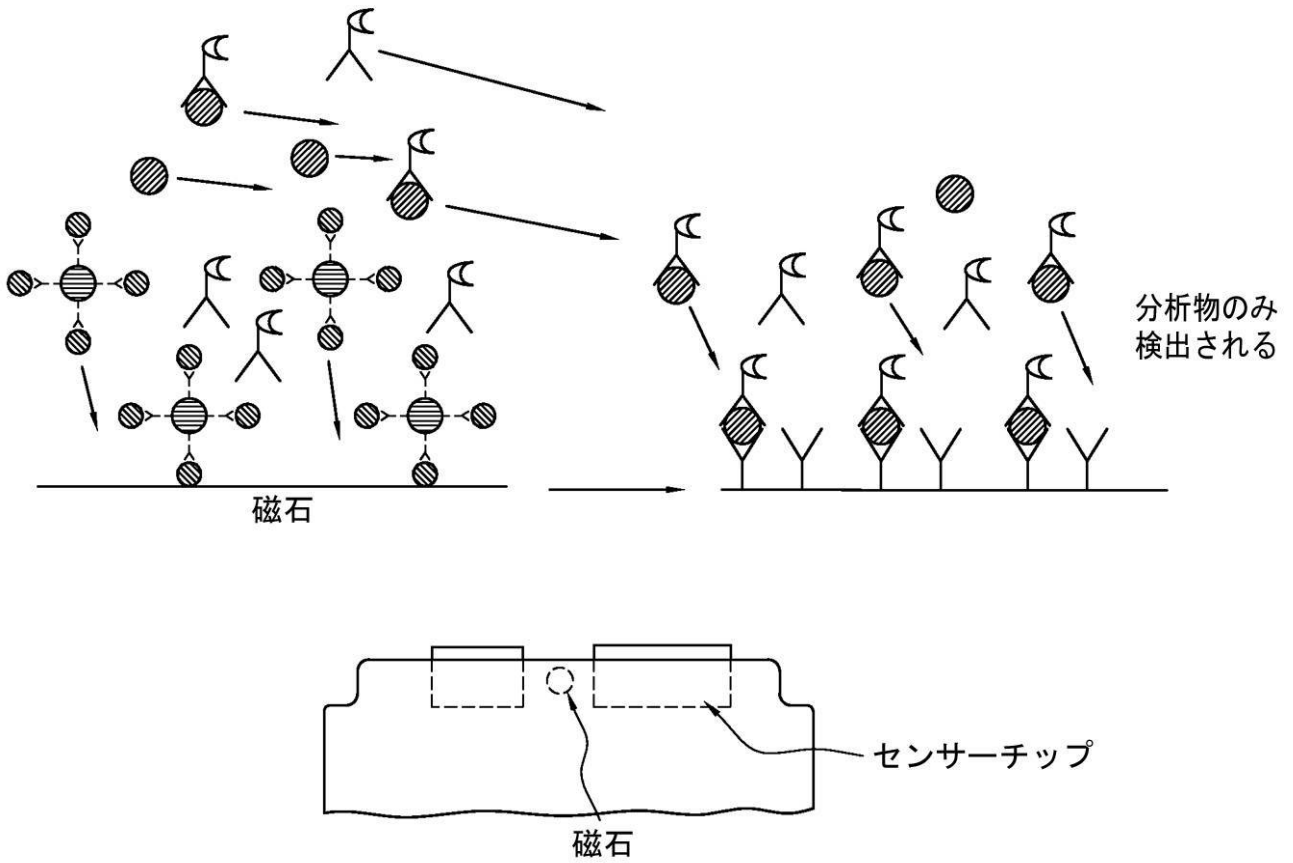
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



Y 捕捉A b

Y スカベンジャーMA b

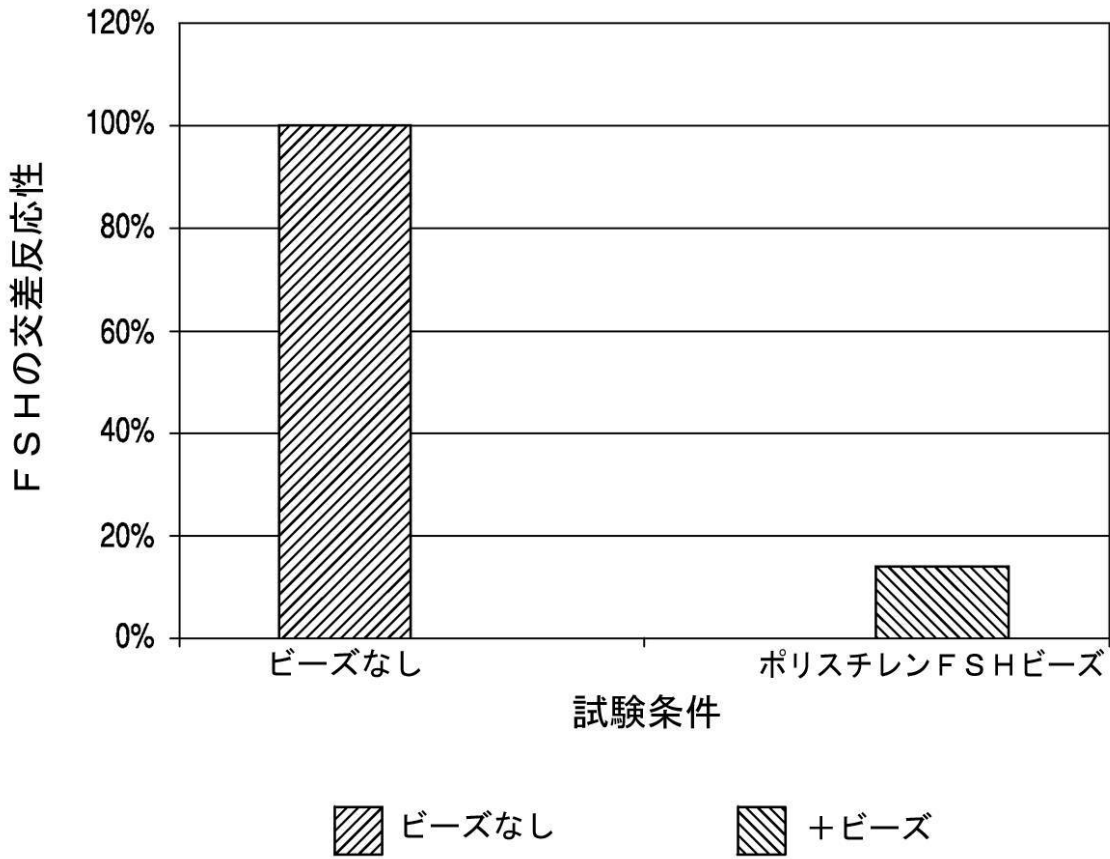
人 標識

● TSH抗原

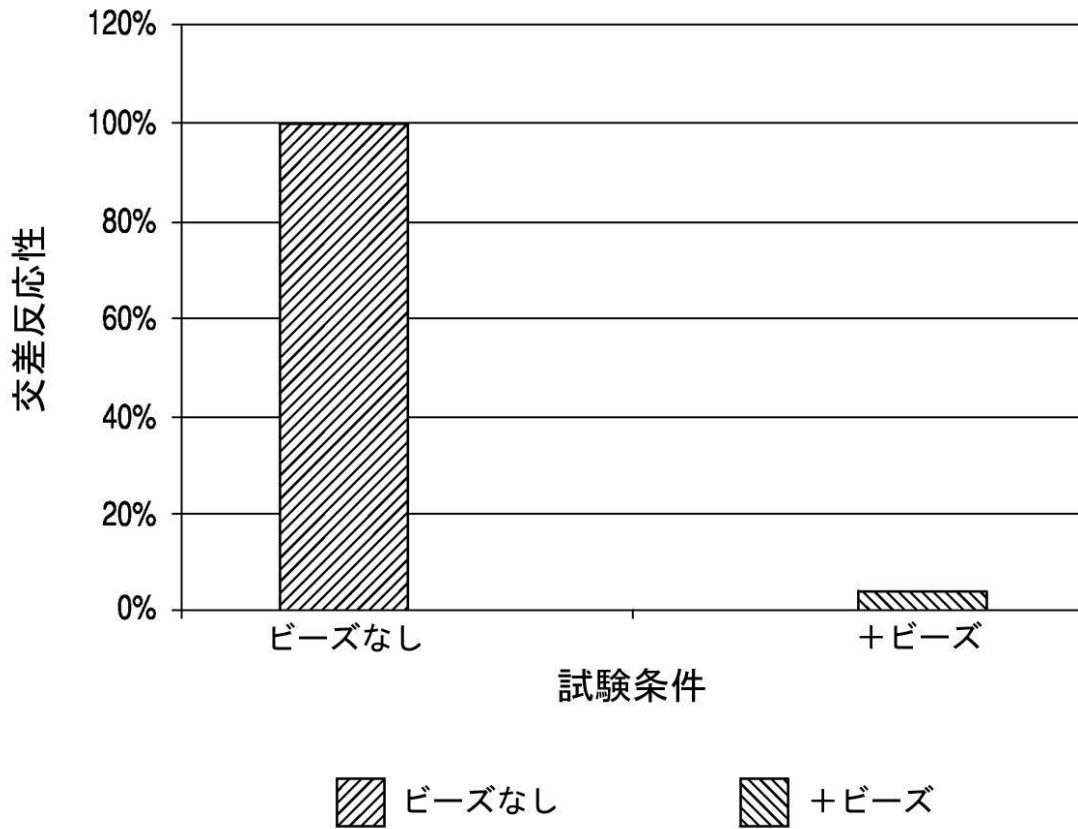
● 交差試薬

● 磁気ビーズ

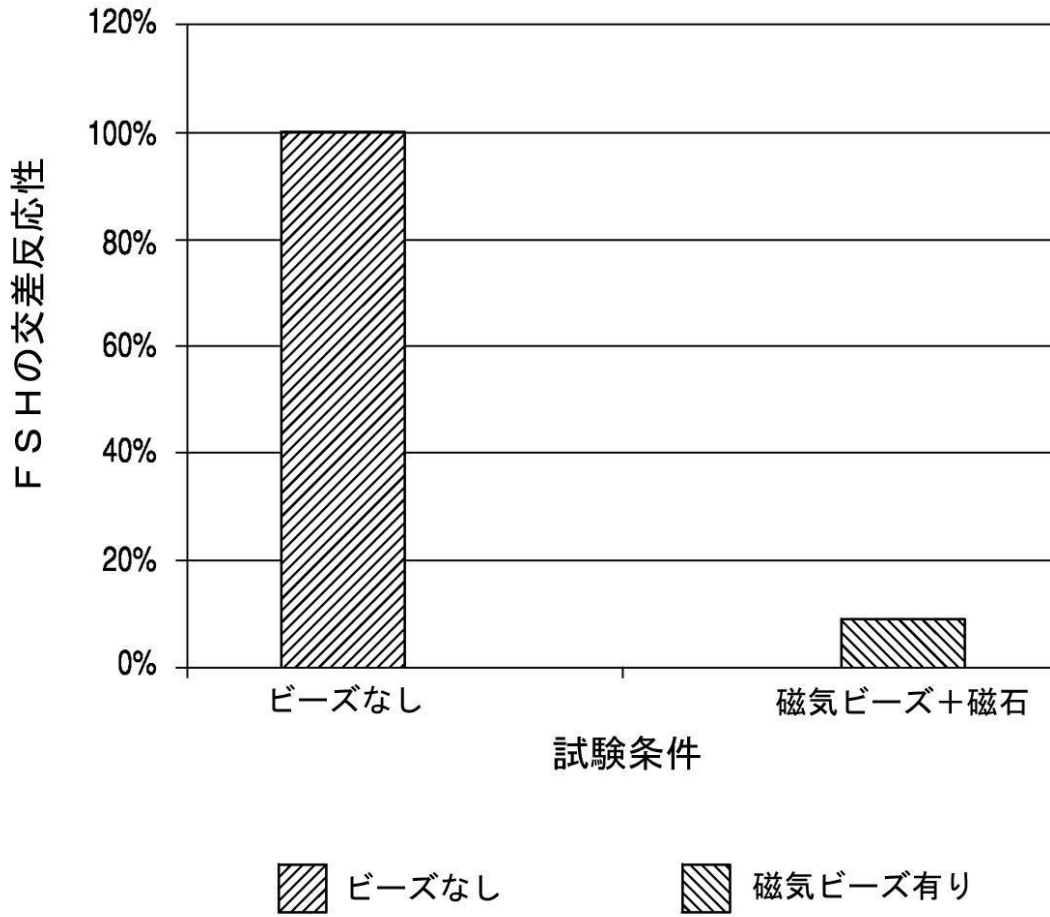
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/062452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/577 G01N33/76 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOOS M ET AL: "A rapid, sensitive two-site immunometric assay for TSH using monoclonal antibodies: Investigation of factors affecting optimisation", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 73, no. 2, 26 October 1984 (1984-10-26), pages 237-249, XP023677315, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/0022-1759(84)90398-3 [retrieved on 1984-10-26] page 239, last paragraph page 240, paragraph 2 - page 241, paragraph 1 ----- -/--	1-13, 35-37
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 17 February 2012		Date of mailing of the international search report 27/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wiesner, Martina

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/062452

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P. HUHTINEN: "Quantitative, Rapid Europium(III) Nanoparticle-Label-Based All-in-One Dry-Reagent Immunoassay for Thyroid-Stimulating Hormone", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 50, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 1935-1936, XP55019732, ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/clinchem.2004.036962 paragraph [0004]	1-13
A	----- "Anti-h TSH 5409 SPTNE-5", 12 May 2010 (2010-05-12), XP55019733, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biospacific.com/products/data/5409-100034.pdf [retrieved on 2012-02-17] the whole document	1-37
A	----- "Anti-h TSH 5405 SP-1", 12 May 2010 (2010-05-12), XP55019734, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biospacific.com/products/data/5405-100030.pdf [retrieved on 2012-02-17] the whole document	1-37
X	----- YLIKOTILA ET AL: "A sensitive TSH assay in spot-coated microwells utilizing recombinant antibody fragments", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 306, no. 1-2, 30 November 2005 (2005-11-30), pages 104-114, XP005197268, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2005.08.002 page 107, right-hand column, paragraph 2-3	1-13, 35-37
A	----- "Anti-h TSH 5404 SP-1", 20 September 2010 (2010-09-20), XP55019735, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biospacific.com/products/data/5404-100025.pdf [retrieved on 2012-02-17] the whole document	1-37
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/062452

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/01229 A1 (BECKMAN COULTER INC [US]) 3 January 2002 (2002-01-03)	14-18, 31-34
Y	page 16, paragraph 2; figures 1-5 page 32, paragraph 3	19-30
A	----- "Matched-Pair Components and Related Products", 8 April 2009 (2009-04-08), XP55019736, Retrieved from the Internet: URL:http://www.blossombio.com/pdf/products /BRO Matched Pairs.pdf [retrieved on 2012-02-17] page 21	1-37
Y	----- WO 03/076937 A2 (I STAT CORP [US]; DAVIS GRAHAM [US]; LAUKS IMANTS R [CA]; LIN CHAO [US]) 18 September 2003 (2003-09-18) cited in the application claims 1-62; figures 1-6	19-30
A	----- Mikael Karlsson: "Determination of antibody affinity and kinetic binding constants in Gyrolab Bioaffy microfluidic CD", 1 January 2008 (2008-01-01), XP55019743, Retrieved from the Internet: URL:liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:18 035/FULLTEXT01 [retrieved on 2012-02-17] figures 3-5; tables 3.1,3.2	1-37
A	----- EP 0 173 973 A2 (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST [JP]) 12 March 1986 (1986-03-12) cited in the application claims 1-2; table 2	1-37
A	----- EP 0 915 336 A2 (SMITHKLINE DIAGNOSTICS INC [US] SMITHKLINE DIAGNOSTICS INC) 12 May 1999 (1999-05-12) paragraphs [0086], [0112] - [0119], [0166], [0171]	1-37
A	----- WO 96/27129 A1 (EHRENKRANZ JOEL R L [US]) 6 September 1996 (1996-09-06) claims 14-19	1-37

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/062452

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0201229	A1	03-01-2002	AU 7150101 A	08-01-2002
			US 6528321 B1	04-03-2003
			WO 0201229 A1	03-01-2002
WO 03076937	A2	18-09-2003	AT 408143 T	15-09-2008
			AU 2003220041 A1	22-09-2003
			CA 2478608 A1	18-09-2003
			CA 2737892 A1	18-09-2003
			EP 1481246 A2	01-12-2004
			ES 2312763 T3	01-03-2009
			JP 4347700 B2	21-10-2009
			JP 4763066 B2	31-08-2011
			JP 2005519304 A	30-06-2005
			JP 2009150902 A	09-07-2009
			US 2003170881 A1	11-09-2003
			US 2009065368 A1	12-03-2009
			US 2011290669 A1	01-12-2011
WO 03076937 A2	18-09-2003			
EP 0173973	A2	12-03-1986	EP 0173973 A2	12-03-1986
			JP 61057857 A	24-03-1986
EP 0915336	A2	12-05-1999	EP 0915336 A2	12-05-1999
			JP 11242030 A	07-09-1999
			US 6087184 A	11-07-2000
WO 9627129	A1	06-09-1996	AU 4996796 A	18-09-1996
			WO 9627129 A1	06-09-1996

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R
O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H
U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI
, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

(72)発明者 スキナー、ジョセフ、ピー .

アメリカ合衆国、イリノイ、レイク ヴィラ、オクスフォード レイン 407

(72)発明者 ルアン、キャオキャオ

アメリカ合衆国、イリノイ、キルディアー、ウェスト クリークサイド ドライブ 21247

(72)発明者 テティン、セルゲイ

アメリカ合衆国、イリノイ、リンデンハースト、コンスティテューション ドライブ 2680

专利名称(译)	在有限洗涤形式的内源污染物存在下进行THS免疫测定和TSH免疫测定的方法		
公开(公告)号	JP2014517302A	公开(公告)日	2014-07-17
申请号	JP2014513497	申请日	2011-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	保健公司雅培点		
[标]发明人	ワンダン コリアーゴードンブルース スキナージョセフピー ルアンキャオキャオ テティンセルゲイ		
发明人	ワン、ダン コリアー、ゴードン、ブルース スキナー、ジョセフ、ピー、 ルアン、キャオキャオ テティン、セルゲイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/76 G01N2333/59 B01L3/50273 B01L3/502738 C07K16/26 C07K2317/33 G01N33/5302 G01N33/543 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/53.C G01N33/543.501.N		
优先权	61/491088 2011-05-27 US		
其他公开文献	JP5938471B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用ELISA夹心测定法的低洗涤甲状腺刺激激素 (TSH) 免疫测定法，所述ELISA夹心测定法具有有限的洗涤步骤或抗原捕获，检测抗体添加和底物导入步骤之间的洗涤步骤。本发明显示出与生物学上相似的干扰交叉反应性物质如卵泡刺激素 (FSH) ，促黄体激素 (LH) 和绒毛膜促性腺激素 (CG) 的低交叉反应性。

捕捉Ab	シグナルAb	FSH	LH	CG
5409	ME130	0.04	0.01	40
ME130	5409	0.04	0.01	7.3
5409	T25C	0.02	0.01	75
T25C	5409	0.02	0.01	12
414B	5409	0.73	0.03	6
5409	414B	11	0.03	7800
対照				
TSH Ab 544	414B	145	0.74*	85,200
414B	TSH Ab 544	10*	0.79	120*

*は不十分なサンドイッチ抗体対を示している。